

# METHOD FOR ISOLATING AND PURIFYING NUCLEIC ACIDS ON SURFACES

**Patent number:** WO9922021

**Publication date:** 1999-05-06

**Inventor:** BASTIAN HELGE (DE); GAUCH SIMONE (DE); OELMUELLER UWE (DE); ULLMANN SUSANNE (DE)

**Applicant:** BASTIAN HELGE (DE); GAUCH SIMONE (DE); OELMUELLER UWE (DE); ULLMANN SUSANNE (DE); QIAGEN GES MIT BESCHRAENKTER H (DE)

**Classification:**

- **international:** C12Q1/68

- **european:** C12N15/10A2, C12N15/10A3, C12Q1/68A4

**Application number:** WO1998EP06756 19981023

**Priority number(s):** DE19971046874 19971023

**Also published as:**

WO0024927 (A1)

EP1049801 (A1)

DE19746874 (A1)

**Cited documents:**

EP0649853

WO8706621

EP0487028

EP0389063

EP0814156

Abstract not available for WO9922021

Abstract of correspondent: DE19746874

The invention relates to novel methods and devices for isolating and purifying nucleic acids on surfaces. The invention is directed at methods which use surfaces, e.g. porous membranes, on which the nucleic acids can be immobilized in a simple manner from the sample containing the nucleic acids, and can be detached again using equally simple method steps. The inventive simple process guidance makes it possible to be able to carry out the methods, particularly, in a completely automatic manner. An additional aspect of the invention is directed at binding nucleic acids to an immobile phase, particularly to a membrane, in such a way that they can be easily detached again from said phase in a successive reaction step, and can optionally be used in additional applications, such as digestion by restriction, RT, PCR or RT-PCR or in every other aforementioned suitable analysis or enzyme reaction. Finally, the invention is directed at special isolation vessels with which the inventive methods can be carried out.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/22021  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06756		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Oktober 1998 (23.10.98)		
(30) Prioritätsdaten: 197 46 874.8 23. Oktober 1997 (23.10.97) DE		
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): QIAGEN GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAF-TUNG [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4, D-40724 Hilden (DE).		
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): BASTIAN, Helge [DE/DE]; Benrather Schloßallee 94a, D-40597 Düsseldorf (DE). GAUCH, Simone [DE/DE]; Benrather Schloßallee 43, D-40597 Düsseldorf (DE). OELMÜLLER, Uwe [DE/DE]; Mehrlrather Weg 46, D-40699 Erkrath (DE). ULLMANN, Susanne [DE/DE]; Trills 19, D-40699 Erkrath (DE).		Mit internationalem Recherchenbericht.
(74) Anwälte: DIEHL, Hermann, O., Th. usw.; Augustenstrasse 46, D-80333 München (DE).		

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING AND PURIFYING NUCLEIC ACIDS ON SURFACES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN AN OBERFLÄCHEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for isolating nucleic acids on surfaces, comprising at least the following steps: charging the nucleic acids on the surface in one same direction; immobilizing the nucleic acids on the surface; stripping the immobilized nucleic acids from the surface and withdrawing the stripped nucleic acids from the surface in the same direction of charging. Preferably, charging is carried out from the top.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren an Oberflächen mit zumindest den Schritten: Beschicken einer Oberfläche aus einer Richtung mit Nukleinsäuren; Immobilisieren der Nukleinsäuren an der Oberfläche; Ablösen der immobilisierten Nukleinsäuren von der Oberfläche; und Abnehmen der abgelösten Nukleinsäuren von der Oberfläche in im wesentlichen der Richtung der Beschickung. Vorzugsweise erfolgt das Beschicken von oben.

### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonland						

## Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren an Oberflächen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren an Oberflächen.

5

Die Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus biologischen und klinischen Probenmaterialien ist von essentieller Bedeutung für Arbeitsbereiche, in denen Nukleinsäure-basierende Arbeitstechniken angewendet werden und in die Nukleinsäure-basierende Techniken gerade Einzug halten. Hierzu zählen zum Beispiel die Vaterschaftsanalyse, Gewebetypisierungen, Identifizierung von Erbkrankheiten, Genomanalyse, molekulare Diagnostik, Bestimmung von Infektionskrankheiten, Tier- und Pflanzenzucht, transgene Forschung, Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Biologie und der Medizin sowie zahlreiche verwandte Arbeitsgebiete. Dabei besteht eine generelle Schwierigkeit darin, biologische bzw. klinische Probenmaterialien so aufzubereiten, daß die in ihr enthaltenen Nukleinsäuren direkt in die jeweilige Analysenmethode eingesetzt werden können.

20

Aus dem Stand der Technik sind bereits zahlreiche Verfahren zur Reinigung von DNA bekannt. So ist es bekannt, Plasmid-DNA beispielsweise zum Zwecke des Klonierens oder auch für andere experimentelle Vorhaben nach dem Verfahren von Birnboim [Methods in Enzymology 100 (1983) 243] zu reinigen. Nach diesem Verfahren wird ein geklärtes Lysat bakteriellen Ursprungs einem Caesiumchlorid Gradienten ausgesetzt und über einen Zeitraum von 4 bis 24 Stunden zentrifugiert. Diesem Verfahrensschritt folgt gewöhnlicherweise die Extraktion und die Praezipitation der DNA. Dieses Verfahren ist mit dem Nachteil verbunden, daß es zum einen apparativ sehr aufwendig und zum anderen sehr zeitaufwendig, kostenintensiv und nicht automatisierbar ist.

Andere Methoden, bei denen geklärte Lysate eingesetzt werden, um DNA zu isolieren, sind die Ionenaustauschchromatographie [Colpan et al., J. Chromatog. 296 (1984) 339] und die

Gelfiltration [Moreau et al. Analyt. Biochem. 166 (1987) 188]. Diese Verfahren bieten sich in erster Linie als Ersatz für den Caesiumchlorid-Gradienten an, machen aber ein aufwendiges System für die Lösungsmittelversorgung sowie die Präzipitation der so gewonnenen DNA-Fraktionen erforderlich, da sie gewöhnlicherweise Salze in hoher Konzentration enthalten und sehr verdünnte Lösungen darstellen.

Marko et al. [Analyt. Biochem. 121 (1982) 382] sowie Vogelstein et al. [Proc. Nat. Acad. Sci. 76 (1979) 615] erkannten, daß, falls die DNA aus Nukleinsäure-enthaltenden Extrakten hohen Konzentrationen von Natriumiodid oder Natriumperchlorat ausgesetzt wird, nur die DNA an mechanisch fein zerkleinerten Glass-Scintillationsröhren sowie zerkleinerten Glasfasermembranen bzw. Glasfiberplatten bindet, während RNA und Proteine nicht binden. Die so gebundene DNA kann ggf. mit Wasser eluiert werden.

So wird in der WO 87/06621 die Immobilisierung von Nukleinsäuren an einer PVDF-Membran beschrieben. Allerdings werden die an die PVDF-Membran gebundenen Nukleinsäuren anschließend nicht eluiert, sondern die Membran wird samt gebundener Nukleinsäuren direkt in einen PCR-Ansatz eingebracht. Letztendlich wird in dieser internationalen Patentanmeldung und in der weiteren Literatur jedoch die Lehre offenbart, daß hydrophobe Oberflächen bzw. Membranen im allgemeinen zuvor mit Wasser oder Alkohol benetzt werden müssen, um die Nukleinsäuren in halbwegs befriedigenden Ausbeuten immobilisieren zu können.

Für eine Reihe von modernen Applikationen, wie z. B. der PCR-, der Reversed -Transcription-PCR, SunRise, LCX- branched-DNA, NASBA, oder TagMan-Technik und ähnlichen Echtzeitquantifizierungsverfahren zur PCR, ist es auf der anderen Seite jedoch absolut notwendig, die Nukleinsäuren direkt von der festen Phase lösen zu können. Hierzu ist der WO

87/06621 die Lehre zu entnehmen, daß die Nukleinsäure zwar von den dort eingesetzten Membranen wiedergewonnen werden kann, daß diese Wiedergewinnung jedoch sehr problematisch ist und bei weitem nicht zur quantitativen Isolierung von Nukleinsäuren geeignet ist. Daneben fallen die so gewonnenen Nukleinsäuren in vergleichsweise sehr hoher Verdünnung an - ein Umstand, der weitere Folgeschritte zwecks Konzentrierung und Isolierung zwangsläufig erforderlich macht.

10 Aus den oben genannten Gründen stellen die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren - insbesondere im Hinblick auf eine Automatisierung des Verfahrensablaufs zur Nukleinsäuregewinnung - keinen geeigneten Ausgangspunkt für eine verfahrenstechnisch möglichst einfache und quantitative Isolierung von  
15 Nukleinsäuren dar.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren zu überwinden und ein Verfahren 20 zur Verfügung zu stellen, welches dazu geeignet ist, ohne erheblichen technischen Mehraufwand vollautomatisch durchgeführt werden zu können.

Gelöst wird die Aufgabe erfindungsgemäß durch das Verfahren 25 gemäß dem unabhängigen Patentanspruch 1, der Verwendung gemäß dem unabhängig Patentanspruch 51 und dem Automaten gemäß dem unabhängigen Patentanspruch 56. Weitere vorteilhafte Aspekte und Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Patentansprüchen, der Beschreibung und den  
30 beigefügten Zeichnungen.

Dabei ist die Erfindung auf ein Verfahren gerichtet, das 35 Oberflächen, z. B. poröse Membranen verwendet, an welche die Nukleinsäuren auf einfache Weise aus der die Nukleinsäuren enthaltenden Probe immobilisiert und mittels ebenso einfacher Verfahrensschritte wieder abgelöst werden können, wobei es die

erfindungsgemäß einfache Prozeßführung ermöglicht, das Verfahren insbesondere vollautomatisch durchführen zu können.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist darauf gerichtet, Nukleinsäuren an eine immobile Phase, insbesondere an eine Membran, in der Art und Weise zu binden, daß sie in einem folgenden Reaktionsschritt ohne weiteres wieder von dieser Phase abgelöst werden können und ggf. in weiteren Anwendungen - wie z. B. Restriktionsverdauung, RT, PCR oder RT-PCR oder in jedweder anderen oben genannten geeigneten Analyse- bzw. Enzymreaktion eingesetzt werden können.

Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren mit den folgenden Schritten bereit:

- Beschicken einer Oberfläche aus einer Richtung mit Nukleinsäuren;
- Immobilisieren der Nukleinsäuren an der Oberfläche;
- Ablösen der immobilisierten Nukleinsäuren von der Oberfläche; und
- Abnehmen der abgelösten Nukleinsäuren von der Oberfläche in im wesentlichen der Richtung der Beschickung.

Vorzugsweise erfolgt das Beschicken von oben. In diesem Fall kann die Gravitation zum Sammeln eines Puffers, der zum Ablösen verwendet wird, und zum Ablösen verwendet werden. Zwischen dem Immobilisierungs- und dem Ablöseschritt kann ein Waschen der immobilisierten Nukleinsäuren mit zumindest einem Waschpuffer erfolgen. Das Waschen umfasst für jeden Waschpuffer vorzugsweise folgende Schritte:

- Aufbringen einer vorbestimmten Menge an Waschpuffer auf die Oberfläche, und
- Durchsaugen des Waschpuffers durch die Oberfläche.

Das Beschicken und Immobilisieren der Nukleinsäuren kann wiederum folgende Schritte umfassen:

- Mischen der Nukleinsäuren mit einem Immobilisierungspuffer,
- Beschicken der Nukleinsäuren mit dem Immobilisierungspuffer auf die Oberfläche, und
- 5 - Durchsaugen der füssigen Bestandteile durch die Oberfläche in im wesentlichen der Richtung der Beschickung.

Das Verfahren weist den großen Vorteil auf, leicht automatisierbar zu sein, so daß zumindest einer der Schritte durch einen Automaten vollautomatisch durchgeführt werden kann. Ebenso ist es möglich, daß alle Schritte des Verfahrens durch einen Automaten in gesteuerter Abfolge durchgeführt werden.

15 Speziell in diesen Fällen, aber auch bei manueller Bearbeitung ist es möglich, daß eine Mehrzahl von Nukleinsäuren gleichzeitig der Isolierung unterworfen werden.

20 Schließlich können in dem erfindungsgemäßen Verfahren zwischen dem Ablöse- und dem Abnehmschritt zumindest einmal folgende Schritte durchgeführt werden:

- Durchführen zumindest einer chemischen Reaktion an den Nukleinsäuren;
- Immobilisieren der Nukleinsäuren an der Oberfläche; und
- 25 - Ablösen der immobilisierten Nukleinsäuren von der Oberfläche.

Wie vorstehend skizziert, wird die Nukleinsäure von der Oberfläche im wesentlichen in derselben Richtung eluiert (abgelöst), in der sie aufgetragen und immobilisiert worden ist. Unter "derselben Richtung" ist dabei im Grunde genommen jede Richtung unter einem Winkel von kleiner oder gleich 180° zu verstehen, so daß bei der Eluierung die Nukleinsäuren jedenfalls nicht die Oberfläche, beispielsweise eine Membran, durchdringen, sondern in Gegenrichtung der Beschickungsrichtung von der Oberfläche entfernt werden, in der sie auf die

Oberfläche aufgebracht worden sind. In bevorzugten Ausführungsformen werden demgegenüber die anderen Puffer, also derjenige Puffer, in dem sich die Nukleinsäuren beim Beschicken befinden, und ggfs. ein Waschpuffer, durch die Oberfläche befinden, und ggfs. ein Waschpuffer, durch die Oberfläche 5 durchgesaugt oder sonstwie transferiert. Wenn die Isolierung an einer in einem Gefäß befindlichen Membran erfolgt, wobei die Membran den gesamten Querschnitt des Gefäßes ausfüllt, ist die bevorzugte Beschickung von oben. Der Abnahmeschritt erfolgt in diesem Fall wiederum nach oben. Fig. 2 zeigt beispielsweise ein 10 trichterförmiges Isoliergefäß, das von oben beschickt wird und bei dem die Abnahme der Nukleinsäuren nach oben erfolgt.

Es versteht sich jedoch, daß auch andere Anordnungen denkbar sind, so z. B. eine Abnahme der Nukleinsäuren von unten. Es ist 15 beispielsweise vorstellbar, daß ein Nukleinsäuren enthaltender Puffer wie ein Lysatpuffer mittels einer Saugvorrichtung aus einem Reaktionsgefäß unmittelbar in ein Isoliergefäß gesaugt wird, so daß sich die Nukleinsäuren an die Unterseite einer Membran in dem Isoliergefäß binden. In einem solchen Fall 20 könnte die Abnahme der Nukleinsäuren von der Oberfläche dadurch erfolgen, daß ein Eluierpuffer von unten aufgesaugt wird und nach Ablösen der Nukleinsäuren wiederum nach unten in ein Gefäß abgelassen wird. Hierbei erfolgt also die Abnahme der Nukleinsäuren nach unten.

Auch eine seitliche Abnahme der Nukleinsäuren ist möglich, 25 beispielsweise wenn eine flachliegende Säule mit einer darin angeordneten Membran im Durchflußverfahren mit einem Lysat bespült wird und im Anschluß die liegende Säule auf der Seite der Membran, an der die Nukleinsäuren binden, mit Eluierpuffer 30 gespült wird.

Ein Beispiel für den maximal möglichen Winkel von 180° ist eine 35 Schräge mit einer zur Bindung von Nukleinsäuren geeigneten Oberfläche, über welche die verschiedenen Lösungen bzw. Puffer herabfließen. Wie alle Puffer, kommt auch der Eluierpuffer von

einer Seite und fließt zur anderen Seite ab. In diesem Fall bilden Einströmrichtung des Puffers und Abströmrichtung des Puffers mit den darin aufgenommenen Nukleinsäuren einen Winkel von 180°, die Abnahme erfolgt jedoch immer noch auf derselben 5 Seite der Oberfläche wie die Immobilisierung.

Unter Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung sollen dabei alle wäßrigen oder sonstigen Lösungen von Nukleinsäuren und ebenso alle Nukleinsäuren enthaltenden biologischen 10 Materialien und biologischen Proben verstanden werden. Dabei wird im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure enthaltende Probe oder ein Material durch eine Probe bzw. einen Probenansatz definiert, die bzw. der Nukleinsäuren enthält, die als geeignete Edukte für in vitro Transkriptionen, PCR- 15 Reaktionen, oder cDNA-Synthesen dienen können - Unter biologischem Material bzw. biologischer Probe sollen dabei z. B. Plasma, Körperflüssigkeiten - wie beispielsweise Blut, Sputum, Urin, Faeces, Sperma, -, Zellen, Serum, Leukozytenfraktionen, Crusta Phlogistica, Abstriche, 20 Gewebeproben jeder Art, Pflanzen und Pflanzenteile, Bakterien, Viren, Hefen etc., wie sie beispielsweise in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 95909684.3 offenbart sind, auf die hiermit inhaltlich Bezug genommen wird - oder auch freie Nukleinsäuren fallen. Unter Nukleinsäuren fallen im Sinne der vorliegenden 25 Erfindung alle möglichen Arten von Nukleinsäuren, wie z. B. Ribonukleinsäuren (RNA) und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) in allen Längen und Konfigurationen, wie Doppelstrang, Einzelstrang, circulär und linear, verzweigt etc.; monomere Nukleotide, Oligomere, Plasmide, virale und bakterielle DNA und 30 RNA, sowie genomische oder sonstige nichtgenomische DNA und RNA aus Tier- und Pflanzenzellen oder anderen Eukaryoten, t-RNA, mRNA in prozessierter und unprozessierter Form, hn-RNA, rRNA und cDNA sowie alle anderen, denkbaren Nukleinsäuren.

35 Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren nimmt man die oben beschriebene, Nukleinsäuren enthaltende Probe in einer Lösung

auf, die geeignete Salze und/oder Alkohol(e) enthält, anschließend ggf. den Ansatz aufschließt und mischt und die so erhaltene Mischung mittels eines Vakuums, auf dem Wege einer Zentrifugation, mittels Überdruck, durch Kapillarkräfte oder durch andere geeignete Verfahren durch eine poröse Oberfläche führt, wobei die Nukleinsäuren an der Oberfläche immobilisiert werden.

Als Salze für das Immobilisieren von Nukleinsäuren an Membranen oder anderen Oberflächen kommen Salze von Alkalimetallen oder Erdalkalimetallen mit Mineralsäuren in Frage; insbesondere Alkali- oder Erdalkalihalogenide bzw. -sulfate worunter die Halogenide des Natriums oder Kaliums oder Magnesiumsulfat besonders bevorzugt werden.

Ferner sind zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens Salze von ein- oder mehrbasischen oder auch polyfunktionellen organischen Säuren mit Alkali- oder Erdalkalimetallen geeignet. Darunter fallen insbesondere Salze des Natriums, des Kaliums oder des Magnesiums mit organischen Dicarbonsäuren - wie z. B. Oxal-, Malon- oder Bernsteinsäure - oder mit Hydroxy- bzw. Polyhydroxycarbonsäuren - wie z. B. bevorzugterweise mit Zitronensäure.

Als besonders zweckmäßig hat sich dabei der Einsatz von sog. chaotropen Agenzien herausgestellt. Chaotrope Substanzen sind in der Lage, die dreidimensionale Struktur der Wasserstoffbrückenbindung zu stören. Hierdurch werden auch die intramolekularen Bindungskräfte geschwächt, die bei der Ausbildung der räumlichen Strukturen, wie z. B. Primär-, Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstrukturen, bei biologischen Molekülen beteiligt sind. Geeignete chaotrope Agenzien sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik hinlänglich bekannt [Römpf, Lexikon der Biotechnologie, Herausgeber: H. Dellweg, R.D. Schmid u. W.E. Fromm, Thieme Verlag: Stuttgart 1992].

Als bevorzugte chaotrope Substanzen gelten gemäß der vorliegenden Erfindung beispielsweise Salze aus der Gruppe der Trichloracetate, Thiocyanate, Perchlorate, Jodide oder Guanidinium-Hydrochlorid und Harnstoff.

5

Die chaotropen Substanzen werden dabei in 0,01 bis 10 molarer wässriger Lösung, bevorzugt in 0,1 bis 7 molarer wässriger Lösung und besonders bevorzugt in 0,2 bis 5 molarer wässriger Lösung eingesetzt. Hierbei können die vorbezeichneten chaotropen Agenzien allein oder in Kombinationen verwandt werden. Insbesondere werden 0,01 bis 10 molare wässrige Lösungen, bevorzugt 0,1 bis 7 molare wässrige Lösungen und besonders bevorzugt in 0,2 bis 5 molare wässrige Lösungen von Natriumperchlorat, Guanidinium-Hydrochlorid, Guanidinium-iso-thiocyanat, Natriumiodid und/oder Kaliumiodid eingesetzt.

Als Alkohole kommen für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zunächst alle Hydroxylderivate von aliphatischen oder acyclischen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffen in Betracht. Dabei ist es zunächst unerheblich, ob diese Verbindung eine, zwei, drei oder mehr Hydroxylgruppen - wie mehrwertige C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkanole, beispielsweise Ethylenglykol, Propylenglykol oder Glycerin - enthalten.

25

Daneben zählen ebenfalls die Zuckerabkömmlinge, die sog. Aldite, wie auch die Phenole - beispielsweise Polyphenole - zu den erfindungsgemäß einsetzbaren Alkoholen.

30

Unter den vorgenannten Hydroxyverbindungen werden die C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkanole - wie Methanol, Ethanol, n-Propanol, tert.-Butanol und die Pentanole besonders bevorzugt.

35

Die Immobilisierung kann unter sauren, neutralen oder basischen Bedingungen durchgeführt werden. So kann der pH bei der Immobilisierung zwischen 3 und 11 liegen, vorzugsweise wird bei

5 einem pH von 4 bis 8 immobilisiert. Wenn RNA isoliert werden soll, liegt der pH vorzugsweise eher im neutralen Bereich, während bei DNA-Isolierungen ein saurer pH günstiger sein kann. So kann der pH für RNA-Isolierungen beispielsweise bei 6 bis 8 liegen, bevorzugterweise bei 6,5 bis 7,5. Für DNA-Isolierungen liegt der pH günstigerweise bei 4 bis 8, vorzugsweise bei 4 bis 6.

10 Als hydrophil gelten im Sinne der vorliegenden Erfindung solche Stoffe bzw. Membranen, die von ihrem chemischen Charakter her sich leicht mit Wasser mischen bzw. Wasser aufnehmen.

15 Als hydrophob gelten im Sinne der vorliegenden Erfindung solche Stoffe bzw. Membranen, die von ihrem chemischen Charakter her nicht in Wasser eindringen - bzw. vice versa - und die nicht darin zu bleiben vermögen.

Unter einer Oberfläche wird im Sinne der vorliegenden Erfindung jede mikroporöse Trennschicht verstanden. Im Falle einer 20 Membran wird die Oberfläche durch eine Folie aus einem polymeren Material gebildet. Das Polymer wird bevorzugt aus Monomeren mit polaren Gruppen aufgebaut.

25 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt der Begriff Oberfläche im weiteren Sinne auch eine Schicht von Partikeln bzw. auch ein Granulat sowie auch Fasern, wie z. B. Silicagelvliese.

Bei Verwendung hydrophober Membranen gelten als bevorzugt im 30 Sinne der vorliegenden Erfindung Membranen, die aus einem hydrophilen Grundmaterial bestehen und die durch eine entsprechende chemische Nachbehandlung, die an sich aus dem Stand der Technik bekannt ist - hydrophobisiert wurden, wie z. B. hydrophobisierte Nylon-Membranen, die kommerziell erhältlich sind.

Unter hydrophobisierten Membranen werden erfindungsgemäß allgemein solche Membranen verstanden, die als unter Umständen ursprünglich hydrophile Membran mit den unten erwähnten Hydrophobisierungsmitteln überzogen wurden. Derartige Hydrophobisierungsmittel überziehen hydrophile Substanzen mit einer dünnen Schicht hydrophober Gruppen, wozu beispielsweise längere Alkylketten oder Siloxangruppen gehören. Geeignete Hydrophobisierungsmittel sind aus dem Stand der Technik in großer Zahl bekannt und stellen erfindungsgemäß Paraffine, Wachse, Metallseifen etc. ggf. mit Zusätzen an Aluminium bzw. Zirkoniumsalzen, quartäre organische Verbindungen, Harnstoffderivate, fettstoffmodifizierte Melaminharze, Silicone, zinkorganische Verbindungen, Glutardialdehyde und ähnliche Verbindungen dar.

Daneben gelten als erfindungsgemäß einsetzbare hydrophobe Membranen solche Membranen, die hydrophobisiert sind und deren Grundmaterial polare Gruppen aufweisen kann. Gemäß dieser Kriterien eignen sich beispielsweise - insbesondere hydrophobisierte - Materialien aus der folgenden Gruppe für den erfindungsgemäßen Einsatz:

Nylon, Polysulfone, Polyethersulfone, Polycarbonate,  
Polyacrylate sowie Acrylsäurecopolymeren, Polyurethane,  
25 Polyamide, Polyvinylchlorid, Polyfluorocarbonate, Polytetra-  
fluoroethylen, Polyvinylidenfluorid, Polyvinylidendifluorid,  
Polyethylentetrafluoroethylen-Copolymerisate, Polyethylen-  
chlorotrifluoroethylen-Copolymerisate oder Polyphenylensulfid  
sowie Cellulose und Cellulose-Mischester oder Nitrocellulosen  
30 wie auch hydrophobisierte Glasfasermembranen, worunter  
hydrophobisierte Nylon-Membrane besonders bevorzugt sind.

Bevorzugte hydrophile Oberflächen umfassen per se hydrophile Materialien und auch hydrophobe Materialien, die hydrophilisiert worden sind. Beispielsweise können verwendet werden hydrophiles Nylon, hydrophile Polyethersulfone,

hydrophile Polycarbonate, Polyester, hydrophile  
Polytetrafluoroethylene auf Polypropylengeweben, hydrophile  
Polytetrafluoroethylene auf Polypropylenvliesen,  
hydrophilisierte Polyvinylidenfluoride,  
5 Polyvinylidendifluoride, hydrophilisierte  
Polytetrafluorethylen und hydrophile Polyamide.

Die Membranen, die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden, haben dabei beispielsweise einen Poredurchmesser von  
10 0,001 bis 50 µm, vorzugsweise 0,01 bis 20 µm und besonders bevorzugt 0,05 bis 10 µm.

Als Waschpuffer kommen ebenfalls die oben beschriebenen Salze oder Alkohole bzw. Phenole oder Polyphenole in Frage. Die  
15 Temperaturen liegen im Waschschnitt in einem Intervall von üblicherweise 10° bis 30 °C, wobei auch höhere Temperaturen erfolgreich angewandt werden können.

Zur Elution der gebundenen Nukleinsäure eignen sich  
20 erfindungsgemäß Wasser oder wässrige Salzlösungen als Elutionsmittel. Als Salzlösungen werden Pufferlösungen eingesetzt, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, wie beispielsweise Morpholinopropansulfonsäure (MOPS),  
25 Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]ethansulfonsäure (HEPES) in einer Konzentration von 0,001 bis 0,5 Mol/Liter, bevorzugt 0,01 bis 0,2 Mol/Liter, besonders bevorzugt 0,01 bis 0,05 molare Lösungen. Daneben werden bevorzugt wässrige Lösungen von Alkali- oder  
30 Erdalkalimetallsalzen, insbesondere deren Halogenide, eingesetzt, darunter 0,001 bis 0,5 molare, bevorzugt 0,01 bis 0,2 molare, besonders bevorzugt 0,01 bis 0,05 molare wässrige Lösungen von Natriumchlorid, Lithiumchlorid, Kaliumchlorid oder Magnesiumdichlorid. Daneben können bevorzugt auch Lösungen von  
35 Salzen der Alkalimetalle oder Erdalkalimetalle mit Carbon- oder Dicarbonsäuren wie Oxalsäure oder Essigsäure, wie Lösungen von Natriumacetat oder -oxalat in Wasser eingesetzt werden,

beispielsweise in dem zuvor genannten Konzentrationsbereich, wie z. B. 0,001 bis 0,5 molare, bevorzugt 0,01 bis 0,2 molare, besonders bevorzugt 0,01 bis 0,05 molare Lösungen.

- 5 Ganz besonders wird reines Wasser als Elutionsmittel bevorzugt, beispielsweise demineralisiertes, bidestilliertes, oder Millipore-Wasser.

Die Eluierung kann bei Temperaturen von 10° bis 70°C, 10 beispielsweise bei 10° bis 30°C oder auch bei höheren Temperaturen erfolgreich durchgeführt werden. Auch ein Eluieren mit Wasserdampf ist möglich.

15 Hinsichtlich der einzelnen Schritte wird das erfindungsgemäße Verfahren wie folgt durchgeführt:

Das Lysat der zur Gewinnung der Nukleinsäuren dienenden Probe oder die ursprünglich freie(n) Nukleinsäure(n) wird/werden beispielsweise in eine (Plastik-)Säule pipettiert, in der - 20 beispielsweise auf dem Boden - die Membran fixiert wird. Zweckmäßigerweise kann die Membran auf einer Fritte fixiert werden, die als mechanische Unterstützung dient. Anschließend wird das Lysat durch die Membran geführt, was durch Anlegen eines Vakuums am Ausgang der Säule erreicht werden kann. Auf 25 der anderen Seite kann der Transport durch einen Lysat-seitigen Überdruck erfolgen. Daneben kann - wie schon zuvor erwähnt - der Lysattransport auf dem Wege der Zentrifugation oder durch die Einwirkung von Kapillarkräften bewerkstelligt werden; letzteres kann zum Beispiel mit einem schwammartigen Material 30 geschehen, das unterhalb der Membran mit dem Lysat bzw. Filtrat in Kontakt gebracht wird.

Der in bevorzugten Ausführungsformen eingefügte Waschschnitt, 35 kann erfolgen, indem der Waschpuffer durch die Oberfläche bzw. Membran hindurchtransportiert wird oder auf derselben Seite der Oberfläche verbleibt wie die Nukleinsäuren. Wird der

Waschpuffer hindurchtransportiert bzw. gesaugt, so kann dies auf unterschiedliche Weisen geschehen, z. B. durch einen auf der anderen Seite der Membran angeordneten Schwamm, eine Saug- oder Überdruckvorrichtung oder durch Zentrifugation oder 5 Gravitation.

Der Vorteil einer Anordnung mit einem schwammartigen Material besteht in einer einfachen, sicheren und bequemen Möglichkeit 10 der Filtrat-Entsorgung - es muß in diesem Fall nur der Schwamm, der nunmehr mit dem Filtrat mehr oder weniger vollgesogen ist, ausgetauscht werden. Es wird an dieser Stelle deutlich, daß die 15 Säule kontinuierlich oder auch batchweise betrieben werden kann und, daß beide Betriebsarten vollautomatisiert durchgeführt werden können, bis die Membran mit Nukleinsäure gesättigt ist. Im letzten Schritt erfolgt die Elution der 20 Nukleinsäure, welche beispielsweise von der Membran abpipettiert bzw. abgehoben oder in sonstiger Weise nach oben entfernt werden kann. Maßgeblich für den Eluier-Schritt im erfindungsgemäßen Verfahren ist jedenfalls, daß die 25 Nukleinsäuren von derselben Seite der Membran abgenommen werden, von der sie der Membran auch zugeführt wurden, daß also kein Durchtritt der Nukleinsäuren durch die Membran zu erfolgen hat. Eine solche Verfahrensanordnung ermöglicht es, alle nicht mehr benötigten Flüssigkeiten, wie den ursprünglichen Lysepuffer und die Waschpuffer, auf eine "Abfallseite" zu saugen oder 30 durch Gravitation dorthin zu bringen, während das Eluat auf der anderen Seite bleibt. Eine solche Anordnung ermöglicht in besonders einfacher Weise eine Automatisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens, da für Zugabe des Lysates und 35 Abnahme des Eluats nur auf einer Seite der Oberflächen eine Pipettierzvorrichtung vorgesehen sein muß, die andere Seite der Oberfläche hingegen keinen "Reinbereich" enthalten muß. Somit lässt sich auch durch die räumliche Trennung eine kontaminationsfreie Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere RNase-Freiheit, in einfachster Weise sicherstellen. Zudem müssen die Isoliergefäße, z. B. Reinigungssäulen, nicht

repositioniert werden, um einerseits Abfall verwerfen zu können, andererseits das Eluat durch dieselbe Öffnung des Gefäßes aufzufangen. Auch dies bedeutet eine Vereinfachung der Automatisierung.

5

Das Auffangen von Fraktionen, welche in großer Verdünnung die gewünschten Nukleinsäuren enthalten, und das anschließende Konzentrierung erfordert, entfällt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren völlig. Vielmehr fallen die gewünschten Nukleinsäuren 10 in schwach oder nicht-salzhaltigen Lösungen in sehr kleinen Volumina an, was von großem Vorteil für alle molekularbiologischen Analyseverfahren ist, da hier gewünscht ist, reine Nukleinsäuren in möglichst kleinen Volumina bei gleichzeitig hoher Konzentration einzusetzen. Um möglichst 15 kleine Volumina an Eluat erzielen zu können, werden als Oberflächen insbesondere Membranen bevorzugt, die möglichst dünn sind, so daß sich nur wenig Flüssigkeit in ihnen ansammeln kann. Weniger bevorzugt sind hingegen Vliese wie z. B. Silicagelvliese, da diese ein relativ großes Volumen an Eluat 20 aufzunehmen vermögen, was das Abnehmen des Eluats nach oben erschwert und das notwendige Eluatvolumen in ungünstiger Weise steigert.

Ferner bietet die vorliegende Erfindung den Vorteil, daß bei 25 einer vertikalen Anordnung des Gefäßes (Membran dann horizontal orientiert) das über der Membran befindliche Volumen als Reaktionsraum genutzt werden kann. So ist es z. B. möglich, nach dem Isolieren und Ablösen der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Nukleinsäuren, diese zunächst nicht 30 abzunehmen, sondern im Isoliergefäß zu belassen und einer molekularbiologischen Applikation - wie Restriktionsverdauung, RT, PCR, RT-PCR oder Enzymreaktionen - zu unterwerfen, die aus diesen Reaktionen hervorgehenden Nukleinsäuren gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren erneut an die Membran zu binden, ggfs. wie beschrieben zu waschen und anschließend zu eluieren, 35

zu isolieren, bzw. zu analysieren, beispielsweise mittels Spektroskopie, Fluorometrie oder ähnlichen Meßverfahren.

5 Die erfindungsgemäß isolierten Nukleinsäuren sind frei von nukleinsäureabbauenden Enzymen und haben eine derartig hohe Reinheit, daß sie unmittelbar in verschiedensten Weisen weiterbehandelt und bearbeitet werden können.

10 Die erfindungsgemäß hergestellten Nukleinsäuren können für Klonierungen verwendet werden und als Substrate für verschiedene Enzyme dienen, wie beispielsweise DNA-Polymerasen, DNA-Restriktionsenzyme, DNA-Ligase und reverse Transkriptase.

15 Die durch das erfindungsgemäße Verfahren bereitgestellten Nukleinsäuren eignen sich in besonders guter Weise zur Amplifikation, insbesondere für die PCR, Strand Displacement Amplifikation, Rolling Circle Verfahren, Ligase Chain Reaction (LCR) und ähnlicher Verfahren.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich weiterhin in besonders guter Weise zur Bereitstellung von Nukleinsäuren für die Verwendung in der Diagnostik, insbesondere für ein Diagnoseverfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die 25 durch das erfindungsgemäße Verfahren gereinigte Nukleinsäure in einem Folgeschritt amplifiziert wird und anschließend und/oder gleichzeitig die so amplifizierte Nukleinsäure detektiert wird (z. B. Holland, P.M. et al., 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 7276 - 7280. Livak, K.J. et al., 1995. PCR Methods Applic. 4, 30 357 - 362; Kievits, T. et al., 1991. J. Virol. Meth. 35, 273 - 286; Uyttendaele, M. et al., 1994. J. Appl. Bacteriol. 77, 694 - 701).

35 Desweiteren eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren in besonders guter Weise zur Bereitstellung von Nukleinsäuren, welche in einem Folgeschritt einem auf einer

Hybridisierungsreaktion basierenden Signalamplifikationsschritt unterzogen werden, insbesondere dadurch gekennzeichnet, daß die durch das erfindungsgemäße Verfahren bereitgestellten Nukleinsäuren mit "Verzweigten Nukleinsäuren", insbesondere  
5 Branched DNA und/oder Branched RNA und/oder entsprechende Dendrimer Nukleinsäuren, wie in den folgenden Literaturstellen beschrieben (z. B. Bresters, D. et al., 1994. J. Med. Virol. 43 (3), 262 - 286; Collins M.L. et al., 1997. Nucl. Acids Res. 25 (15), 2979 - 2984; ), in Kontakt gebracht werden und das  
10 entstehende Signal detektiert wird.

Im folgenden wird ein Beispiel für die Automatisierbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens erläutert und werden Beispiele für die Durchführung des Verfahrens mit verschiedenen Oberflächen  
15 und Nukleinsäuren angegeben. Hierbei wird Bezug genommen auf die beigefügten Zeichnungen, in denen folgendes dargestellt ist.

Fig. 1 zeigt einen zur Durchführung des erfindungsgemäßen  
20 Verfahrens geeigneten Automaten in einer schematisierten Darstellung.

Fig. 2 zeigt eine erste Ausführungsform eines Isoliergefäßes und Abfallbehälters zur Durchführung des erfindungsgemäßen  
25 Verfahrens.

Fig. 3 zeigt eine zweite Ausführungsform eines Isoliergefäßes und Abfallbehälters zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.  
30

Fig. 4 zeigt eine dritte Ausführungsform eines Isoliergefäßes und Abfallbehälters zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

35 Fig. 5 zeigt die Absorption einer Probe im Bereich von 220 bis 320 nm.

Fig. 6 zeigt das Ethidiumbromid-gefärbte Gel einer elektrophoretischen Auftrennung verschiedener Proben nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

5

Fig. 7 zeigt ein weiteres Ethidiumbromid-gefärbtes Gel einer elektrophoretischen Auftrennung verschiedener Proben nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise teilweise oder vollständig, d.h. in allen seinen Schritten, automatisiert durchgeführt. Ein Beispiel für einen geeigneten Automaten ist in Fig. 1 dargestellt, bei dem ein Hauptteil 1 mit Steuerungselektronik und Antriebsmotoren mit einer Arbeitsplattform 3 und einem fahrbaren Arm 2 ausgestattet ist. Auf der Arbeitsplattform sind verschiedene Elemente positioniert, so Bereiche 4 zur Halterung von verschiedenen Gefässen. Eine Absaugvorrichtung 5 dient zum Absaugen von Flüssigkeiten aus darüber positionierten, nach unten offenen Isoliergefässen, oder sonst mit der Absaugvorrichtung verbundenen Gefässen. Ein Rüttler 6 ist ebenfalls vorgesehen, der beispielsweise zum Lysieren von biologischen Proben verwendet werden kann. Die verwendeten Anordnungen von Isoliergefässen sind beispielsweise Spritzgußteile mit integrierten Isoliergefässen, in die erfindungsgemäße Oberflächen eingelegt sind. Es können typischerweise 8, 12, 24, 48, 96 oder bis zu 1536 Isoliergefäße vorgesehen sein, wie sie z.B. in den Formaten moderner Multi-Well-Platten zur Verfügung gestellt werden. Auch noch höhrere Isoliergefäßzahlen in einer Anordnung sind vorstellbar, wenn entsprechende Standards zur Verfügung stehen. Mit Hilfe von Luer-Adaptoren ist es jedoch auch möglich, die Böden der Anordnungen separat bereitzustellen und je nach Bedarf mit einem oder mehreren Isoliergefässen zu bestücken. Auch einzeln gearbeitete Isoliergefäße ohne Luer-Adapter werden von der Erfindung umfasst.

Unter einer Saug- und Dispensierzvorrichtung 8 werden die Anordnungen von Isoliergefäßen in den Automaten eingesetzt und über diese können Flüssigkeiten aufgenommen und abgegeben werden. Hierbei können mehrere einzelne Saugrohre vorgesehen sein, um mehr als ein Isolier- oder Reaktionsgefäß gleichzeitig bearbeiten zu können. Die Saug und Dispensierzvorrichtung 8 erfüllt also die Funktion einer Pipette. Sog und Druck werden der Saug- und Dispensierzvorrichtung 8 über Schläuche 9 vermittelt.

10

Zur Nukleinsäureisolierung können beispielsweise Reaktionsgefässe mit Zellen in den Rüttler/Halter 6 eingesetzt werden, in die mit der Dispensierzvorrichtung 8 Lysepuffer eingefüllt wird. Nach Mischen werden die Zelllysate in Isoliergefäße überführt. Die Anordnung von Isoliergefäßen wird daraufhin auf die Absaugvorrichtung 5 aufgesetzt und der Lysepuffer durch die Oberflächen in den Isoliergefäßen durchgesaugt. Im Anschluß kann die Oberfläche mit einem Waschpuffer gespült werden, um Reste der Zelllysate zu entfernen, wobei auch der Waschpuffer nach unten abgesaugt wird. Schließlich wird Eluat in die Isoliergefäße dispesiert und nach eventuellem nochmaligem Rütteln werden die abgelöste Nukleinsäuren nach oben entnommen und in Aufbewahrungsgefäße überführt.

25

Üblicherweise werden Wechselspitzen an der Saug- und Dispensierzvorrichtung 8 verwendet, um eine Kontamination der Proben zu verhindern.

30

Die Fig. 2 bis 4 zeigen verschiedene Beispiele für geeignete Isoliergefäße zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung.

35

In Fig. 2 ist ein trichterförmiges Isoliergefäß 10 mit einer Oberfläche 11, beispielsweise einer Membran, versehen, die auf einen Auffangbehälter 12 aufgesetzt ist, der ein schwammartiges Material 13 enthält, das der Aufnahme von Lysepuffer und

Waschpuffer dient. In den Trichter wird Lysat oder eine sonstige Aufbereitung von Nukleinsäuren 14 gegeben. Das schwammartige Material 13 saugt die aufgetragene Flüssigkeit durch die Membran 11 hindurch. Vor der Zugabe des Eluatpuffer wird der Schwamm etwas von der Membran beabstandet, beispielsweise durch eine im Auffangbehälter 12 angeordnete Mechanik (nicht dargestellt). So wird beim letzten Schritt verhindert, daß der Eluatpuffer auch durch die Membran 11 gesaugt wird. Dieser verbleibt vielmehr auf der Oberfläche (Fig. 1b) und kann zusammen mit den Nukleinsäuren nach oben entnommen werden. Mit dieser Anordnung wird die Absaugvorrichtung 5 im Automaten nicht benötigt.

Fig. 3 zeigt ein weiteres Beispiel eines Isoliergefäßes, daß über einen an seinem unteren Ende angeordneten Luer-Anschluß mittels eines Luer-Adapters 17 mit einem Auffangbehälter 16 verbunden ist, der in diesem Fall keinen Schwamm enthält, sondern mittels eines Stutzen 18 mit einer Absaugvorrichtung verbunden ist. Lyse- und Waschpuffer können hier also durch Anlegen eines Vakuums durch die Membran 11 durchgesaugt werden. Beim Auftragen des Eluatpuffers bleibt das Vakuum abgeschaltet, so daß sich das Eluat nach oben entnehmen lässt. Durch die Verwendung eines Luer-Anschlusses sind individuelle Isoliergefäße der Anordnung von Isoliergefäßen entnehmbar. Es versteht sich jedoch, daß der Vakumauffangbehälter auch mit fest angebrachten Isoliergefäßen kombinierbar ist.

Fig. 4 zeigt schließlich eine Ausführungsform, bei der ein Auffangbehälter vorgesehen ist, in den die Puffer mittels Schwerkraft hineingesaugt werden. Der Eluatpuffer, der in geringem Volumen verwendet wird, hat kein hinreichendes Eigengewicht, um die Membran 11 zu durchdringen und kann wiederum nach oben abgenommen werden.

Die vorbeschriebene Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert. Hierbei sind Beispiele 1 bis 17 im

wesentlichen auf die Verwendung hydrophober Oberflächen gerichtet und Beispiele 1b bis 2b auf die Verwendung hydrophiler Oberflächen. Verschiedenartige, andere Ausgestaltungen der Verfahren werden für den Fachmann aus der vorstehenden Beschreibung und den Beispielen ersichtlich. Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß diese Beispiele und die diesen zugeordnete Beschreibung lediglich zum Zweck der Erläuterung vorgesehen und nicht als Einschränkung der Erfindung anzusehen sind.

10

#### Beispiel 1

##### Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen

15 In einer Plastiksäule werden kommerziell erhältliche hydrophobe Nylon-Membranen (Beispielsweise ein Material der Fa. MSI: Magna SH mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm oder ein Material der Fa. Pall GmbH: Hydrolon mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm), die durch chemische Nachbehandlung hydrophobisiert wurden, 20 einlagig eingebracht. Die Membranen werden auf einer Polypropylenfritte, die als mechanische Unterstützung dient, plaziert. Die Membranen werden in der Plastiksäule durch einen Spannring fixiert.

25 Die so vorbereitete Säule wird über eine Luerverbindung mit einer Vakuumkammer verbunden - alle Isolierungsritte werden mit Hilfe eines angelegten Vakuums durchgeführt.

30 Zur Isolierung werden  $5 \times 10^5$  HeLa-Zellen durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand entfernt. Die Zellen werden durch Zugabe von 150 µl eines handelsüblichen Guanidinium-isothiocyanat-Puffer - wie z. B. RLT-Puffer der Fa. Qiagen - auf an sich aus dem Stand der Technik bekannte Weise lysiert. Dabei wird die Lyse durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder 35 vortixen über einen Zeitraum von ca. 5 s unterstützt. Anschließend werden 150 µl 70 %-iges Ethanol zugefügt und durch

Auf- und Abpipettieren oder durch vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s gemischt.

Das Lysat wird anschließend in die Plastiksäule pipettiert und durch Evakuierung der Vakuumkammer durch die Membran gesaugt. Unter den so eingestellten Bedingungen bleibt die RNA an der Membran gebunden. Anschließend wird mit einem ersten handelsüblichen Guanidinium-iso-thiocyanat-haltigen Waschpuffer - beispielsweise mit dem Puffer RW1 der Fa. Qiagen - und danach mit einem zweiten Tris-haltigen bzw. TRIS- und alkohol-haltigen Waschpuffer - z. B. mit dem Puffer RPE der Fa. Qiagen - gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Evakuierung der Vakuumkammer durch die Membran gesaugt. Nach dem letzten Waschschnitt wird das Vakuum über einen Zeitraum von ca. 10 min aufrechterhalten, um die Membran zu trocknen. danach wird die Vakuumkammer belüftet.

Zur Elution werden 70 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran abzulösen. Nach einer Inkubation über einen Zeitraum von 1 min bei einer Temperatur im Bereich von 10° bis 30°C wird das Eluat mittels einer Pipette von oben von der Membran abpipettiert und der Elutionsschritt wird zum Zweck einer vollständigen Elution noch einmal wiederholt.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird anschließend durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Qualität der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt (vgl. Fig. 5: Gesamt-RNA über Hydrolon 1.2 isoliert)

Die Ergebnisse der zwei Isolierungen mit hydrophoben Nylonmembranen (Nr. 1 und 2) sind in der nachfolgenden Tabelle 1 Vergleichsversuche, in denen zum einen hydrophiles Nylon

(Nyaflo) (Nr. 3) sowie eine Silica-Membran eingesetzt wurde (Nr. 4), gegenübergestellt. Die dort wiedergegebenen Werte liefern einen überzeugenden Beleg für die beeindruckende Isolierungsleistung sowie Trennwirkung der erfindungsgemäß eingesetzten Materialien. Sie zeigen weiterhin, daß Silica-gelvliese eine deutlich geringe Ausbeute erbringen, was vermutlich auf ihre vlisartige Struktur und die damit verbundene Absorption des größten Teiles des Eluatpuffers zurückzuführen ist.

10

Tabelle 1: RNA-Ausbeute und -Reinheit der nach Beispiel 1 isolierten Gesamt-RNA

15

Nr	Membrantypus	Ausbeute an Gesamt-RNA [µg]	E <sub>260</sub> /E <sub>280</sub>
1	Magna SH 1.2 µm (hydrophobes Nylon)	6.0	1.97
2	Hydrolon 1.2 µm (hydrophobes Nylon)	7.1	2.05
3	Nyaflo (hydrophiles Nylon)	< 0.2	nicht bestimmt
4	Hydrophile Silica-Membran	< 0.2	nicht bestimmt

Die isolierte RNA kann ferner auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert werden. Hierzu werden beispielsweise 1,2 %-ige Formaldehyd-Agarose-Gele angefertigt. Das Ergebnis ist in Fig. 6 wiedergegeben.

In Fig. 6 verkörpert Spur 1 eine Gesamt-RNA, die über eine hydrophobe Nylon-Membran des Ursprungs Magna SH mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm isoliert wurde.

Spur 2 stellt eine Gesamt-RNA dar, die über eine hydrophobe Nylon-Membran des Ursprungs Hydrolon mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm isoliert wurde.

30

Spur 3 stellt das Chromatogramm einer Gesamt-RNA dar, die über eine Silica-Membran isoliert wurde.

Dabei wurden jeweils 50 µl der Gesamt-RNA Isolate analysiert.  
5 Fig. 6 liefert einen deutlichen Beleg dafür, daß unter Verwendung der Silica-Membran kein meßbarer Anteil an Gesamt-RNA isoliert werden kann.

#### Beispiel 2

10 Isolierung freier RNA durch Bindung der RNA an hydrophobe Membranen mittels verschiedener Salz/Alkohol-Gemische. Bei diesem Beispiel werden Lysat und Waschlösungen durch Anlegen eines Vakuums über die hydrophobe Membran geführt.

15 In Plastiksäulen, die mit einer Vakuumkammer in Verbindung stehen, werden hydrophobe Nylon-Membranen (beispielsweise Hydroolon 1.2 µm der Fa. Pall) analog Beispiel 1 eingebbracht.

20 100 µl einer Gesamt-RNA enthaltenden wässrigen Lösung werden jeweils mit 350 µl eines kommerziell erhältlichen Guanidinium-iso-thiocyanat enthaltenden Lysepuffers (beispielsweise Puffer RLT der Fa. Qiagen), 350 µl 1.2 M Natriumacetat-Lösung, 350 µl 2 M Natriumchlorid-Lösung, 350 µl 4 M Lithiumchlorid-Lösung  
25 durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Anschließend werden jeweils 250 µl Ethanol zugegeben und ebenfalls durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die RNA-haltigen Lösungen werden danach in die Plastiksäulen  
30 einpipettiert und durch Evakuierung der Vakuumkammer durch die Membran gesaugt. Unter den beschriebenen Bedingungen bleibt die RNA an den Membranen gebunden. Die Membranen werden anschließend - wie in Beispiel 1 beschrieben - gewaschen.

Abschließend wird die RNA - ebenfalls wie in Beispiel 1 beschrieben - von oben - von der Membran mittels einer Pipette entnommen.

- 5 Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei 260 nm ermittelt. - Die Qualität der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung der Verhältnisse der Lichtabsorption bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt.

10

15

Tabelle 2: Isolierung freier RNA durch Bindung der RNA an hydrophobe Membranen mittels verschiedener Salz/Alkohol-Gemische

Nr	Salz/Alkohol-Gemisch	Ausbeute an Gesamt-RNA [µg]	$E_{260}/E_{280}$
1	RLT-Puffer Qiagen / 35 %-iges Ethanol	9.5	1.92
2	0.6 M Natriumacetat / 35 %-iges Ethanol	8.5	1.98
3	1.0 M Natriumchlorid / 35 %-iges Ethanol	7.9	1.90
4	2 M Lithiumchlorid / 35 %-iges Ethanol	4.0	2.01

### Beispiel 3

20

#### Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen

25

In einer Plastiksäule werden kommerziell erhältliche hydrophobe Membranen, die aus verschiedenen Materialien bestehen, einlagig eingebracht. Die Membranen werden auf einer Polypropylenfritte, die als mechanische Unterstützung dient, plaziert und durch einen Spannring in der Plastiksäule fixiert. Die so vorbereitete Säule wird in ein Collection Tube gesetzt, die folgenden Isolierungsschritte werden mittels einer Zentrifugation durchgeführt.

30

Zur Isolierung werden  $5 \times 10^5$  HeLa-Zellen durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen werden durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  eines handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-Puffers - wie z. B. RLT-Puffer der Fa. Qiagen - auf an sich aus dem Stand der Technik bekannte Weise lysiert.

5        Dabei wird die Lyse durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen über einen Zeitraum von 5 s unterstützt. Anschließend werde 150  $\mu\text{l}$  70 %-iges Ethanol zugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen über 10        einen Zeitraum von 5 s gemischt.

Das Lysat wird anschließend in die Plastiksäule pipettiert und durch Zentrifugation bei 10000 x g für 1 min durch die Membran geführt. Anschließend wird mit einem handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen Waschpuffer - beispielsweise 15        mit dem Puffer RW1 der Fa. Qiagen - und danach mit einem zweiten Tris- und alkoholhaltigen Waschpuffer - beispielsweise Puffer RPE der Fa. Qiagen - gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation durch die Membran geführt. Der letzte Waschschnitt wird bei 20000 x g für 2 min 20        durchgeführt, um die Membran zu trocknen.

Zur Elution werden 70  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran zu lösen. Nach einer Inkubation von 1 - 2 min bei einer Temperatur im Bereich von 10 - 30 °C wird das Eluat mittels einer Pipette von 25        oben von der Membran abpipettiert. Der Elutionsschritt wird einmal wiederholt, um eine vollständige Elution zu erreichen.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird anschließend durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Qualität der RNA wird 30        durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt.

Die Ergebnisse der Isolierungen mit den verschiedenen hydrophoben Membranen sind in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgeführt. Es werden 3 - 5 Parallelversuche pro Membran 35        durchgeführt und jeweils der Mittelwert errechnet. Durch die Verwendung einer Silica-Membran kann kein meßbarer Anteil an

Gesamt-RNA isoliert werden, wenn das Eluat durch eine Abnahme von oben von der Membran gewonnen wird.

Tabelle 3: RNA-Ausbeute der nach Beispiel 3 isolierten Gesamt-RNA durch Bindung an hydrophobe Membranen

5

Hersteller	Membran	Material	RNA ( $\mu$ g)	260 nm/ 280 nm
Pall Gelman Sciences	Hydrolon, 1,2 $\mu$ m	hydrophobes Nylon	6.53	1.7
Pall Gelman Sciences	Hydrolon, 3 $\mu$ m	hydrophobes Nylon	9.79	1.72
Pall Gelman Sciences	Fluoro Trans G	hydrophobes, carboxyliertes Polyvinylidendifluorid	6.16	1.72
Pall Gelman Sciences	NFWA	Acrylpolymer auf Nylongewebestützkörper	2.91	1.73
Pall Gelman Sciences	Hemasep V Medium	modifiziertes Polyester	4.16	1.74
Pall Gelman Sciences	Hemadyne	modifiziertes Polyester	6.67	1.65
Pall Gelman Sciences	V-800 R	leicht hydrophobes modifiziertes Acryl-Copolymer	6.26	1.72
Pall Gelman Sciences	Supor-450 PR	hydrophobes Polyethersulfon	3.96	1.76
Pall Gelman Sciences	Versapor - 1200R	leicht hydrophobes modifiziertes Acryl-Copolymer	6.23	1.68
Pall Gelman Sciences	Versapor - 3000R	leicht hydrophobes modifiziertes Acryl-Copolymer	3.54	1.74
Pall Gelman Sciences	Zefluor	Polytetrafluorethylen	5.19	1.65
Pall Gelman Sciences	Polypro - 450	Polyesterfaser	4.58	1.77
GORE - TEX	Polypropylen-Lochfolie 93	hydrophobes Polytetrafluorethylen	3.6	1.59
GORE - TEX	Polypropylen-Lochfolie 93	hydrophobes Polytetrafluorethylen	2.15	1.65
GORE - TEX	Polypropylen-Lochfolie 93	hydrophobes Polytetrafluorethylen	1.59	1.72
GORE - TEX	Polyester-Vlies 9316	hydrophobes Polytetrafluorethylen	3.61	1.69
GORE - TEX	Polyprop.-Vlies 9317	hydrophobes Polytetrafluorethylen	2.87	1.70
Millipore	Mitex Membrane	hydrophobes Polytetrafluorethylen	1.98	1.62
Millipore	DVHP	hydrophobes Polyvinylidenfluorid	7.45	1.72
MSI	Magna-SH. 1,2 $\mu$ m	hydrophobes Nylon	4.92	1.69
MSI	Magna-SH. 5 $\mu$ m	hydrophobes Nylon	10.2	1.71
MSI	Magna-SH. 10 $\mu$ m	hydrophobes Nylon	7.36	1.76
MSI	Magna-SH. 20 $\mu$ m	hydrophobes Nylon	7.04	1.65

## 10 Beispiel 4

## Isolierung freier RNA aus wäßriger Lösung

Entsprechend dem Beispiel werden Plastiksäulen mit verschiedenen hydrophoben Membranen hergestellt.

100 µl einer Gesamt-RNA enthaltenden wäßrigen Lösung wird mit 350 µl eines kommerziell erhältlichen Guanidinium-Isothiocyanat enthaltenden Lysepuffers - z. B. RLT-Puffer der Fa. Qiagen vermischt. Anschließend werden 250 µl Ethanol zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Dieses Gemisch wird dann auf die Säule aufgetragen und durch Zentrifugation (10000 x g; 5 min) durch die Membran geführt. Die Membranen werden anschließend zweimal mit einem Puffer - z. B. RPE der Fa. Qiagen - gewaschen. Der Puffer wird jeweils durch Zentrifugation durch die Membranen geführt. Der letzte Waschschnitt wird bei 20000 x g durchgeführt, um die Membranen zu trocknen.

Abschließend wird die RNA wie bereits im Beispiel 3 beschrieben mit RNase-freiem Wasser eluiert und mittels einer Pipette von 10 der Membran abgenommen.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird anschließend durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt und die Qualität der RNA durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt.

Die Ergebnisse der Isolierungen mit den verschiedenen hydrophoben Membranen sind in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgeführt. Es werden 3 - 5 Parallelversuche pro Membran durchgeführt und jeweils der Mittelwert errechnet. Durch die Verwendung einer Silica-Membran kann kein meßbarer Anteil an 15 Gesamt-RNA isoliert werden, wenn das Eluat durch eine Abnahme 20 von oben von der Membran gewonnen wird.

Tabelle 4: Isolierung freier RNA aus wässriger Lösung durch Bindung an hydrophobe Membranen

Hersteller	Membran	Material	RNA (µg)	260 nm/ 280 nm
Pall Gelman Sciences	Hydrolon, 1.2 µm	hydrophobes Nylon	5,15	1,75
Pall Gelman Sciences	Hydrolon, 3 µm	hydrophobes Nylon	0,22	1,79
Pall Gelman Sciences	Fluoro Trans G	hydrophobes, carboxyliertes Polyvinylidendifluorid	5,83	1,79
Pall Gelman Sciences	NFWA	Acrylpolymer auf Nylongewebestützkörper	1,85	1,72
Pall Gelman Sciences	Hemasep V Medium	modifiziertes Polyester	4	1,79
Pall Gelman Sciences	Hemadyne	modifiziertes Polyester	0,47	2,1
Pall Gelman Sciences	V-800 R	leicht hydrophobes modifiziertes Acryl-Copolymer	2,74	1,77
Pall Gelman Sciences	Supor-450 PR	hydrophobes Polyethersulfon	5,97	1,71
Pall Gelman Sciences	Zefluor	Polytetrafluorethylen	8,67	1,69
Pall Gelman Sciences	Polypro - 450	Polyesterfaser	5,09	1,78
GORE - TEX	Polypropylen-Lochfolie 9337	hydrophobes Polytetrafluorethylen	5,96	1,62
GORE - TEX	Polypropylen-Lochfolie 9336	hydrophobes Polytetrafluorethylen	7,43	1,71
GORE - TEX	Polypropylen-Lochfolie 9335	hydrophobes Polytetrafluorethylen	4,35	1,63
GORE - TEX	Polyester-Vlies 9316	hydrophobes Polytetrafluorethylen	5,92	1,67
GORE - TEX	Polyprop.-Vlies 9317	hydrophobes Polytetrafluorethylen	8,7	1,66
Millipore	Fluropore PTFE	hydrophobes Polytetrafluorethylen	8,46	1,70
Millipore	DVHP	hydrophobes Polyvinylidenfluorid	4,23	1,8
MSI	Magna-SH, 1.2 µm	hydrophobes Nylon	1,82	1,76

5

### Beispiel 5

Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen in Abhängigkeit von  
der Porengröße der Membran

Entsprechend dem Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit verschiedenen hydrophoben Membranen unterschiedlicher Porengröße hergestellt.

Nach Beispiel 1 wird ein Zell-Lysat aus  $5 \times 10^5$  HeLa-Zellen hergestellt und über die Säulen geführt. Anschließend werden die Membran mit den kommerziell erhältlichen Puffern RW1 und RPE der Fa. Qiagen mittels Zentrifugation gewaschen. Der letzte Zentrifugationsschritt wird bei  $20000 \times g$  für 2 min durchgeführt, um die Membranen zu trocknen. Die Elution wird wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 5 aufgeführt. Es werden 3 - 5 Parallelversuche pro Membran durchgeführt und jeweils der Mittelwert errechnet.

15

Tabelle 5: RNA-Ausbeute der isolierten Gesamt-RNA durch Bindung an hydrophobe Membranen unterschiedlicher Porengröße

Hersteller	Membran	Material	Porengr. (µm)	RNA (µg)	260 nm/ 280 nm
Infiltec	Polycon 0.01	Hydrophiles Polycarbonat	0.01	0.17	1.64
Pall Gelman Sciences	Fluoro Trans G	hydrophobes, carboxyliertes Polyvinylidendifluorid	0.2	6.16	1.72
Pall Gelman Sciences	Supor-450 PR	hydrophobes Polyethersulfon	0.45	3.96	1.76
Millipore	DVHP	hydrophobes Polyvinylidenfluorid	0.65	7.45	1.72
MSI	Magna-SH	hydrophobes Nylon	1.2	4.92	1.69
MSI	Magna-SH	hydrophobes Nylon	5	10.2	1.71
MSI	Magna-SH	hydrophobes Nylon	10	7.36	1.76
MSI	Magna-SH	hydrophobes Nylon	20	7.04	1.65

20

### Isolierung von genomischer DNA aus wäßriger Lösung

Entsprechend Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit hydrophoben Membranen (beispielsweise Magna-SH, 5 µm der Fa. MSI) hergestellt. Die Durchführung der Aufreinigung wird mit handelsüblichen Puffern der Fa. Qiagen durchgeführt.

5        200 µl einer wäßrigen Lösung genomischer DNA aus Lebergewebe wird in PBS-Puffer hergestellt. Zu dieser Lösung werden 200 µl eines Guanidinium-Hydrochlorid-haltigen Puffers - z. B. AL der Firma Qiagen - gegeben und vermischt. Anschließend werden 10        210 µl Ethanol zugegeben und durch Vortexen vermischt. Das Gemisch wird entsprechend Beispiel 3 auf die Säule getragen und durch Zentrifugation durch die Membran geführt. Die Membran wird anschließend mit einem alkoholhaltigen Puffer - z. B. RW der 15        Firma Qiagen - gewaschen und getrocknet. Die Elution wird wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Es werden drei Parallelversuche durchgeführt und der Mittelwert errechnet.

Die Menge an isolierter DNA wird anschließend durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer 20        Wellenlänge von 260 nm ermittelt und beträgt ca. 30 % der Ausgangsmenge. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm beträgt 1,82.

### 25        Beispiel 7

#### Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe

Entsprechend Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit hydrophoben 30        Membranen (beispielsweise Magna-SH, 5 µm der Fa. MSI) hergestellt. Die Durchführung der Aufreinigung wird mit handelsüblichen Puffern der Fa. Qiagen durchgeführt.

10 mg Nierengewebe (Maus) wird mit 180 µl ATL versetzt und durch einen mechanischen Homogenisator zermahlen. Anschließend 35        wird Proteinase K (ca. 0,4 mg gelöst in 20 µl Wasser) zum Ansatz gegeben und bei 55 °C für 10 min inkubiert. Nach Zusatz

von 200 µl eines Guanidinium-Hydrochlorid-haltigen Puffers - z. B. AL der Firma Qiagen - Mischen und einer 10 minütigen Inkubation bei 70 °C wird 200 µl Ethanol unter den Ansatz gemischt. Dieses Gemisch wird auf die Säule getragen und durch 5 Zentrifugation über die Membran geführt. Die Membran wird mit einem alkoholhaltigen Puffer - z. B. RW der Fa. Qiagen - gewaschen und anschließend durch Zentrifugation getrocknet. Die Elution wird wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Es werden drei Parallelversuche durchgeführt und der Mittelwert 10 errechnet.

Die Menge an isolierter DNA wird anschließend durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt und beträgt im Durchschnitt 9,77 µg. Das Verhältnis der Absorption bei 260/280 nm beträgt 15 1,74.

#### Beispiel 8

20 Immobilisierung von Gesamt-RNA aus wäßriger Lösung mittels unterschiedlicher chaotroper Agenzien

Entsprechend Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit hydrophoben Membranen hergestellt.

25 100 µl einer Gesamt-RNA enthaltenden wäßrigen Lösung wird mit 350 µl eines Lysepuffers, der Guanidinium-Isothiocyanat bzw. Guanidinium-Hydrochlorid in unterschiedlichen Konzentrationen enthält, vermischt. Anschließend werden 250 µl Ethanol zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Dieses 30 Gemisch wird dann auf die Säule aufgetragen und durch Zentrifugation (10000 x g; 1 min) durch die Membran geführt. Die Membranen werden anschließend zweimal mit einem alkoholhaltigen Puffer - z. B. RPE der Fa. Qiagen - gewaschen. Der Puffer wird jeweils durch Zentrifugation durch die 35 Membranen geführt. Der letzte Waschschritt wird bei 20000 x g durchgeführt, um die Membranen zu trocknen. Die Elution wird

wie in Beispiel 3 durchgeführt. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt und jeweils der Mittelwert angegeben.  
Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt.

5 Tabelle 6: RNA-Ausbeute aus wässriger Lösung mittels chaotroper Agenzien

Membran	chaotropes Agens und Konzentration im Bindeansatz	Ausbeute an Gesamt-RNA (µg)
Hydrolon, 1.2 µm	GITC, 500 mM	2.3
Hydrolon, 1.2 µm	GITC, 1 M	0.8
Hydrolon, 1.2 µm	GITC, 3 M	0.9
Fluoro Trans G	GITC, 500 mM	0.4
Fluoro Trans G	GITC, 1 M	1.25
Fluoro Trans G	GITC, 3 M	0.6
Hydrolon, 1.2 µm	GuHCl, 500 mM	2.6
Hydrolon, 1.2 µm	GuHCl, 1 M	6.7
Hydrolon, 1.2 µm	GuHCl, 3 M	2.9
Fluoro Trans G	GuHCl, 500 mM	0.4
Fluoro Trans G	GuHCl, 1 M	1.25
Fluoro Trans G	GuHCl, 3 M	0.6

10 **Beispiel 9**

Immobilisierung von Gesamt-RNA aus wässriger Lösung mittels unterschiedlicher Alkohole

15 Entsprechend Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit hydrophoben Membranen hergestellt.

100 µl einer Gesamt-RNA enthaltenden wässrigen Lösung wird mit 350 µl eines Guanidinium-Iothiocyanat enthaltenden Lysepuffers (Konzentration 4 M) vermischt. Anschließend werden

20 unterschiedliche Mengen an Ethanol bzw. Isopropanol zugegeben und mit RNase-freiem Wasser auf 700 µl aufgefüllt und gemischt. Dieses Gemisch wird dann auf die Säule aufgetragen und entsprechend Beispiel 4 durch die Membran geführt und gewaschen. Die Elution erfolgte ebenfalls wie in Beispiel 3. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt und jeweils der Mittelwert angegeben.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt.

5

Tabelle 7: RNA-Ausbeute aus wäßriger Lösung mit unterschiedlichen Alkoholen im Bindeansatz

Membran	Alkohol und Konzentration im Bindeans	Ausbeute an Gesamt-RNA (µg)
Hydrolon, 1,2 µm	Ethanol, 5 %	0.7
Hydrolon, 1,2 µm	Ethanol, 30 %	2.85
Hydrolon, 1,2 µm	Ethanol, 50 %	4.5
DVHP	Ethanol, 5 %	0.4
DVHP	Ethanol, 30 %	1.25
DVHP	Ethanol, 50 %	0.6
Hydrolon, 1,2 µm	Isopropanol, 5 %	0.35
Hydrolon, 1,2 µm	Isopropanol, 30 %	4.35
Hydrolon, 1,2 µm	Isopropanol, 50 %	3.2
DVHP	Isopropanol, 10 %	1.35
DVHP	Isopropanol, 30 %	4.1
DVHP	Isopropanol, 50 %	3.5

### Beispiel 10

10

Immobilisierung von Gesamt-RNA aus wäßriger Lösung mit unterschiedlichen pH-Werten

15

Entsprechend Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit hydrophoben Membranen hergestellt.

20

100 µl einer Gesamt-RNA enthaltenden wäßrigen Lösung wird mit 350 µl eines Guanidinium-Isothiocyanat enthaltenden Lysepuffers (Konzentration 4 M) vermischt. Der Puffer enthält 25 mM Natrium-Citrat und wird auf unterschiedliche pH-Werte mittels HCl bzw. NaOH eingestellt. Anschließend wird 250 µl Ethanol zugegeben und gemischt. Dieses Gemisch wird dann auf die Säule aufgetragen und entsprechend Beispiel 4 durch die Membran geführt und gewaschen. Die Elution erfolgte ebenfalls wie in Beispiel 3. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt und jeweils der Mittelwert angegeben.

25

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: RNA-Ausbeute aus wäßriger Lösung mit unterschiedlichen pH-Werten im Bindeansatz

5

Membran	pH-Wert im Bindeansatz	Ausbeute an Gesamt-RNA ( $\mu$ g)
Hydrolon, 1,2 $\mu$ m	pH 3	0,15
Hydrolon, 1,2 $\mu$ m	pH 9	1,6
Hydrolon, 1,2 $\mu$ m	pH 11	0,05
Fluoro Trans G	pH 1	0,45
Fluoro Trans G	pH 9	2,85
Fluoro Trans G	pH 11	0,25

## 10 Beispiel 11

Immobilisierung von Gesamt-RNA aus wäßriger Lösung mittels unterschiedlicher Salze

15 Entsprechend Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit hydrophoben Membranen hergestellt.

100  $\mu$ l einer Gesamt-RNA enthaltenden wäßrigen Lösung wird mit 350  $\mu$ l eines salzhaltigen Lysepuffers (NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>) vermischt. Anschließend wird 250  $\mu$ l H<sub>2</sub>O oder Ethanol zugegeben und gemischt. Dieses Gemisch wird dann auf die Säule aufgetragen und entsprechend Beispiel 4 durch die Membran geführt, gewaschen und eluiert. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt und jeweils der Mittelwert angegeben.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: RNA-Ausbeute aus wäßriger Lösung mit verschiedenen Salzen im Bindeansatz

Membran	Salz-Konzentration im Bindeansatz	Ausbeute an Gesamt-RNA (µg)
Hydrolon, 1.2 µm	NaCl, 100 mM; ohne Ethanol	0.1
Hydrolon, 1.2 µm	NaCl, 1 M; ohne Ethanol	0.15
Hydrolon, 1.2 µm	NaCl, 5 M; ohne Ethanol	0.3
Hydrolon, 1.2 µm	KCl, 10 mM; ohne Ethanol	0.2
Hydrolon, 1.2 µm	KCl, 1 M; ohne Ethanol	0.1
Hydrolon, 1.2 µm	KCl, 3 M; ohne Ethanol	0.25
Hydrolon, 1.2 µm	MgSO <sub>4</sub> , 100 mM; ohne Ethanol	0.05
Hydrolon, 1.2 µm	MgSO <sub>4</sub> , 750 mM; ohne Ethanol	0.15
Hydrolon, 1.2 µm	MgSO <sub>4</sub> , 2 M; ohne Ethanol	0.48
Hydrolon, 1.2 µm	NaCl, 500 mM; mit Ethanol	2.1
Hydrolon, 1.2 µm	NaCl, 1 M; mit Ethanol	1.55
Hydrolon, 1.2 µm	NaCl, 2.5 M; mit Ethanol	1.35
Hydrolon, 1.2 µm	KCl, 500 mM; mit Ethanol	1.6
Hydrolon, 1.2 µm	KCl, 1 M; mit Ethanol	2.1
Hydrolon, 1.2 µm	KCl, 1.5 M; mit Ethanol	3.5
Hydrolon, 1.2 µm	MgSO <sub>4</sub> , 10 mM; mit Ethanol	1.9
Hydrolon, 1.2 µm	MgSO <sub>4</sub> , 100 mM; mit Ethanol	4.6
Hydrolon, 1.2 µm	MgSO <sub>4</sub> , 500 M; mit Ethanol	2

## 5 Beispiel 12

Immobilisierung von Gesamt-RNA aus wäßriger Lösung mittels unterschiedlicher Pufferbedingungen

- 10 Entsprechend Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit hydrophoben Membranen hergestellt.  
 100 µl einer Gesamt-RNA enthaltenden wäßrigen Lösung wird mit 350 µl eines Guanidinium-Isothiocyanat enthaltenden Lysepuffers (Konzentration 2,5 M) vermischt. Der Lysepuffer wird mit 15 verschiedenen Konzentrationen an Natrium-Citrat, pH 7, bzw. Natrium-Oxalat versetzt. Anschließend wird 250 µl Ethanol zugegeben und gemischt. Dieses Gemisch wird dann auf die Säule aufgetragen und entsprechend Beispiel 4 durch die Membran geführt, gewaschen und eluiert.
- 20 Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 aufgeführt. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt und jeweils der Mittelwert angegeben.

Tabelle 10: RNA-Ausbeute aus wäßriger Lösung mit verschiedenen Pufferkonzentrationen im Bindeansatz

Membran	Natrium-Citrat im Lysepuffer	Ausbeute an Gesamt-RNA ( $\mu$ g)
Hydrolon, 1,2 $\mu$ m	Na-Citrat, 10 mM	2,2
Hydrolon, 1,2 $\mu$ m	Na-Citrat, 100 mM	2,4
Hydrolon, 1,2 $\mu$ m	Na-Citrat, 500 mM	3,55
Supor-450 PR	Na-Citrat, 10 mM	1,1
Supor-450 PR	Na-Citrat, 100 mM	1,15
Supor-450 PR	Na-Citrat, 500 mM	0,2
Hydrolon 1,2 $\mu$ m	Na-Oxalat, 1 mM	1,5
Hydrolon 1,2 $\mu$ m	Na-Oxalat, 25 mM	1,05
Hydrolon 1,2 $\mu$ m	Na-Oxalat, 50 mM	0,9
Supor-450 PR	Na-Oxalat, 1 mM	1,9
Supor-450 PR	Na-Oxalat, 25 mM	1,3
Supor-450 PR	Na-Oxalat, 50 mM	1,7

5

### Beispiel 13

#### Immobilisierung von Gesamt-RNA aus wäßriger Lösung durch Phenol

10

Entsprechend Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit hydrophoben Membranen (beispielsweise Hydrolon, 1,2  $\mu$ m der Fa. Pall Gelman Sciences) hergestellt.

15

Wäßrige RNA-Lösung wird mit 700  $\mu$ l Phenol vermischt und über die Membranen mittels Zentrifugation geführt. Entsprechend Beispiel 4 werden die Membranen gewaschen und die RNA eluiert. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt und jeweils der Mittelwert angegeben.

20

Die Menge an isolierter RNA wird anschließend durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt und beträgt im Durchschnitt 10,95  $\mu$ g. Das Verhältnis der Absorption bei 260/280 nm beträgt 0,975.

25

### Beispiel 14

Waschen der immobilisierten Gesamt-RNA unter verschiedenen Salzkonzentrationen

Entsprechend Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit hydrophoben Membranen hergestellt.

5        100 µl einer Gesamt-RNA enthaltenden wäßrigen Lösung wird mit 350 µl eines Guanidinium-Iothiocyanat enthaltenden Lysepuffers (Konzentration 4 M) vermischt. Anschließend wird 250 µl Ethanol zugegeben und gemischt. Dieses Gemisch wird dann auf die Säule 10 aufgetragen und entsprechend Beispiel 4 durch die Membran geführt. Die Membranen werden anschließend zweimal mit einem Puffer, der unterschiedliche Konzentrationen an NaCl und 80 % Ethanol enthält, gewaschen. Der Puffer wird jeweils durch Zentrifugation durch die Membranen geführt. Der letzte 15 Waschschritt wird bei 20000 x g durchgeführt, um die Membranen zu trocknen. Die Elution erfolgt ebenfalls wie in Beispiel 3. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt und jeweils der Mittelwert angegeben.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt.

20

Tabelle 11: RNA-Ausbeute aus wäßriger Lösung mit NaCl im Waschpuffer

Membran	NaCl im Waschpuffer	Ausbeute an Gesamt-RNA (µg)
Hydrolon, 1,2 µm	NaCl, 10 mM	1,4
Hydrolon, 1,2 µm	NaCl, 50 mM	3,15
Hydrolon, 1,2 µm	NaCl, 100 mM	3
DVHP	NaCl, 10 mM	2,7
DVHP	NaCl, 50 mM	2,85
DVHP	NaCl, 100 mM	2,7

25        Beispiel 15

Elution der immobilisierten Gesamt-RNA unter verschiedenen Salz- und Pufferbedingungen

Entsprechend Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit hydrophoben Membranen hergestellt.

- 100 µl einer Gesamt-RNA enthaltenden wäßrigen Lösung wird mit 5 350 µl eines Guanidinium-Isothiocyanat enthaltenden Lysepuffers (Konzentration 4 M) vermischt. Anschließend wird 250 µl Ethanol zugegeben und gemischt. Dieses Gemisch wird dann auf die Säule aufgetragen und entsprechend Beispiel 3 durch die Membran geführt und gewaschen.
- 10 Zur Elution werden 70 µl einer NaCl-haltigen Lösung, eines Tris/HCl-Puffers (pH 7) oder einer Natrium-Oxalat Lösung (pH 7,2) auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran zu lösen. Nach einer Inkubation von 1 - 2 min bei einer Temperatur im Bereich von 10 - 30 °C wird das Eluat mittels 15 einer Pipette von oben von der Membran abpipettiert. Der Elutionsschritt wird einmal wiederholt, um eine vollständige Elution zu erreichen. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt und jeweils der Mittelwert angegeben.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

20

Tabelle 12: RNA-Ausbeute aus wäßriger Lösung mit NaCl bzw. Tris/HCl im Elutionspuffer

Membran	NaCl bzw. Tris im Elutionspuffer	Ausbeute an Gesamt-RNA (µg)
Hydrolon, 1.2 µm	NaCl, 1 mM	1.35
Hydrolon, 1.2 µm	NaCl, 50 mM	1.2
Hydrolon, 1.2 µm	NaCl, 250 mM	0.45
DVHP	NaCl, 1 mM	0.9
DVHP	NaCl, 50 mM	0.35
DVHP	NaCl, 500 mM	0.15
Hydrolon, 1.2 µm	Tris, 1 mM	0.35
Hydrolon, 1.2 µm	Tris, 10 mM	0.75
DVHP	Tris, 1 mM	1.5
DVHP	Tris, 50 mM	1
DVHP	Tris, 250 mM	0.1
Hydrolon 1.2 µm	Na-Oxalat, 1 mM	0.45
Hydrolon 1.2 µm	Na-Oxalat, 10 mM	0.65
Hydrolon 1.2 µm	Na-Oxalat, 50 mM	0.3
DVHP	Na-Oxalat, 1 mM	?
DVHP	Na-Oxalat, 10 mM	1.55
DVHP	Na-Oxalat, 50 mM	0.15

**Beispiel 16**

Einsatz von Gesamt-RNA in einer "Real Time" Quantitativen RT-  
PCR unter Verwendung des 5'-Nuklease PCR-Assays zur  
Amplifikation und Detektion von  $\beta$ -Aktin mRNA

Entsprechend dem Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit einer kommerziell erhältlichen Membran (Pall-Gelman Sciences, Hydrolon 1,2  $\mu\text{m}$ ) hergestellt. Zur Isolierung von RNA werden 1 x  $10^5$  HeLa-Zellen eingesetzt und die Aufreinigung der Gesamt-RNA wird wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Die Elution erfolgt mit 2 x 60  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O wie in Beispiel 3 beschrieben. Zur vollständigen Entfernung restlicher geringer Mengen an DNA wird die Probe mit einer DNase vor der Analyse behandelt. Es wird eine "Ein-Gefäß 'Real Time' Quantitative RT-PCR" unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Reagenzsystems von Perkin-Elmer (TaqMan<sup>TM</sup> PCR Reagent Kit) unter Einsatz einer M-MLV Reversen Transkriptase durchgeführt. Durch den Einsatz spezifischer Primer und einer spezifischen TaqMan-Sonde für  $\beta$ -Aktin (TaqMan<sup>TM</sup>  $\beta$ -Actin Detection Kit der Firma Perkin Elmer) werden die  $\beta$ -Aktin mRNA-Moleküle in der Gesamt-RNA Probe zunächst in  $\beta$ -Aktin cDNA umgeschrieben und anschließend direkt ohne Unterbrechung der Gesamtreaktion in dem gleichen Reaktionsgefäß amplifiziert und detektiert. Die Reaktionsansätze werden entsprechend den Anweisungen des Herstellers hergestellt. Es werden drei verschiedene Mengen an der isolierten Gesamt-RNA verwendet (1, 2, 4  $\mu\text{l}$  Eluat) und eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Als Kontrolle werden drei Ansätze ohne RNA mitgeführt. Die cDNA Synthese findet für 1 Stunde bei 37 °C statt, direkt gefolgt von einer PCR, die 40 Zyklen umfaßt. Die Reaktionen und die Analysen werden auf einem ABI PRISM<sup>TM</sup> 7700 Sequence Detector der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems durchgeführt. Jedes während eines PCR-Zyklus entstehende Amplikon erzeugt ein lichtemittierendes Molekül,

das durch Abspaltung von der TaqMan-Sonde entsteht. Damit ist das insgesamt entstehende Lichtsignal direkt proportional zur entstehenden Amplikonmenge und damit zur ursprünglich in der Gesamt-RNA Probe vorhandenen Transkriptmenge. Das emmitierte  
5 Licht wird von dem Gerät gemessen und durch ein Computerprogramm ausgewertet. Der PCR-Zyklus, bei dem das Lichtsignal das erste Mal sicher oberhalb des Hintergrundrauschens detektiert wird, wird als "Threshold Cycle" (ct) bezeichnet. Dieser Wert ist ein Maß für die in der  
10 Probe vorhandene Menge an der spezifisch amplifizierter RNA. Für die eingesetzte Menge von 1 µl an mit dem hier beschriebenen Verfahren isolierter Gesamt-RNA ergibt sich ein durchschnittlicher ct-Wert von 17,1, für 2 µl an Gesamt-RNA ein ct-Wert von  
15 16,4 und für 4 µl an Gesamt-RNA ein ct-Wert von 15,3. Hieraus ergibt sich ein linearer Zusammenhang von eingesetzter Gesamt-RNA und dem ct-Wert. Dies zeigt, daß die Gesamt-RNA frei Substanzen ist, die die Amplifikationsreaktion hemmen könnten. Die Kontrollansätze, die keine RNA enthalten,  
erzeugen keine Signale.

20

#### Beispiel 17

Einsatz von Gesamt-RNA in einer RT-PCR zur Amplifikation und  
25 Detektion von β-Aktin mRNA.

Entsprechend dem Beispiel 3 werden Plastiksäulen mit einer kommerziell erhältlichen Membran (Fa. Pall Gelman Sciences, Hydrolon der Porengröße 1,2 bzw. 3 µm; Fa. Sartorius,  
30 Sartolon der Porengröße 0,45 µm) hergestellt.

Zur Isolierung von RNA werden zwei verschiedene Ausgangsmaterialien eingesetzt;

- 1) Gesamt-RNA aus Leber (Maus) in wäßriger Lösung, Aufreinigung und Elution erfolgt wie in Beispiel 4 beschrieben und

35

2)  $5 \times 10^5$  HeLa-Zellen, die Aufreinigung der Gesamt-RNA sowie die Elution wird wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt.

5 Es werden jeweils 20 ng der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Als Kontrolle wird RNA, die mittels des RNeasy-Kits (Fa. Qiagen) aufgereinigt wurde, und ein Ansatz ohne RNA mitgeführt.

10 Es wird eine RT-PCR unter Standardbedingungen mit diesen Proben durchgeführt. Für die Amplifikation werden zwei verschiedene Primerpaare für das  $\beta$ -Aktin verwendet. Ein 150 Bp großes Fragment dient als Nachweis der Sensitivität, ein 1,7 kBp großes Fragment dient der Integrität der RNA. Aus der 15 RT-Reaktion wird 1  $\mu$ l entnommen und in der anschließenden PCR eingesetzt. Es werden für das kleine Fragment 25 Zyklen, für das große Fragment 27 Zyklen durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur beträgt 55°C. Die Amplifikate werden anschließend auf einem nicht denaturierenden Gel aufgetragen 20 und analysiert.

Für die eingesetzte Menge von 20 ng an mit dem hier beschriebenen Verfahren isolierter Gesamt-RNA lassen sich in 25 der RT-PCR die entsprechenden DNA-Fragmente nachweisen. Bei Verwendung von Gesamt-RNA aus Mausleber lässt sich kein Transkript nachweisen, die hier verwendeten Bedingungen sind auf humanes  $\beta$ -Aktin angepasst. Die Kontrollansätze, die keine RNA enthalten, erzeugen keine Signale.

30 Fig. 7 zeigt Ethidiumbromid-gefärbte Gele einer elektrophoretischen Auftrennung der RT-Reaktionen.

A: Spur 1 bis 8: RT-PCR eines 150 Bp-Fragmentes; Spur 1, 2: RNA aus wäßriger Lösung mit der Membran Hydrolon 1,2  $\mu$ m aufgereinigt; Spur 3, 4: RNA aus HeLa-Zellen mit der 35 Membran Sartolon aufgereinigt; Spur 5, 6: RNA aus HeLa-

Zellen mit der Membran Hydrolon 3  $\mu\text{m}$  aufgereinigt; Spur 7: RNA aufgereinigt mittels RNeasy-Mini-Kit; Spur 8: Kontrolle ohne RNA.

5 B: Spur 1 bis 8: RT-PCR eines 1,7 kBp-Fragmentes; Spur 1, 2: RNA aus wässriger Lösung mit der Membran Hydrolon 1,2  $\mu\text{m}$  aufgereinigt; Spur 3, 4: RNA aus HeLa-Zellen mit der Membran Sartolon aufgereinigt; Spur 5, 6: RNA aus HeLa-Zellen mit der Membran Hydrolon 3  $\mu\text{m}$  aufgereinigt; Spur 7: RNA aufgereinigt  
10 mittels RNeasy-Mini-Kit; Spur 8: Kontrolle ohne RNA.

#### Beispiel 1b

15 Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen durch Bindung an hydrophile Membranen

In einer Plastiksäule werden kommerziell erhältliche hydrophile Membranen, die aus verschiedenen Materialien bestehen, einlagig eingebracht. Entsprechend Beispiel 3 werden die Membranen auf 20 einer Polypropylenfritte plaziert und durch einen Spannring fixiert.

Zur Isolierung werden  $5 \times 10^5$  HeLa-Zellen eingesetzt. Die folgenden Isolierungsschritte und die Elution der Nucleinsäure werden wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt.

25 Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird anschließend durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Qualität der RNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt.

30 Die Ergebnisse der Isolierungen mit den verschiedenen hydrophilen Membranen sind in der nachfolgenden Tabelle 1b aufgeführt. Es werden 2 - 5 Parallelversuche pro Membran durchgeführt und jeweils der Mittelwert errechnet. Durch die Verwendung einer Silica-Membran kann kein meßbarer Anteil an 35 Gesamt-RNA isoliert werden, wenn das Eluat durch eine Abnahme von oben von der Membran gewonnen wird.

Tabelle 1b: RNA-Ausbeute der nach Beispiel 1b isolierten Gesamt-RNA durch Bindung an hydrophile Membranen

Hersteller	Membran	Material	RNA ( $\mu$ g)	260 nm/ 280nm
Pall Gelman Sciences	I.C.E.-450	hydrophiles Polyethersulfon	6.36	1.8
Pall Gelman Sciences	I.C.E.-450sup	hydrophiles Polyethersulfon auf einem Polyester gewebe	3.07	1.71
Pall Gelman Sciences	Premium Release	hydrophile Polyester membran	1.66	1.63
Pall Gelman Sciences	Supor - 800	hydrophiles Polyethersulfon	4.12	1.7
Pall Gelman Sciences	Supor - 450	hydrophiles Polyethersulfon	4.69	1.69
Pall Gelman Sciences	Supor - 100	hydrophiles Polyethersulfon	3.25	1.71
GORE - TEX	Polypropylen 9339	hydrophiles Polytetrafluorethylen auf Polypropylen Gewebe	1.08	1.65
GORE - TEX	Polypropylen-Vlies 9338	hydrophiles Polytetrafluorethylen auf Polypropylen-Vlies	3.97	1.67
GORE - TEX	Polyester-Vlies 9318	hydrophiles Polytetrafluorethylen auf Polypropylen-Vlies	3.61	1.69
Millipore	Durapore PVDF	hydrophilisiertes Polyvinylidenfluorid	5.6	1.69
Millipore	hydrophylisierte PTFE	hydrophilisiertes Polytetrafluorethylen	3.14	1.66
Millipore	Durapore PVDF	hydrophilisiertes Polyvinylidenfluorid	3.12	1.68
Sartorius	Membranfilter Typ 250	hydrophiles Polyamid	4.3	1.66
Infiltec	Polycon 0.01	hydrophiles Polycarbonat	0.17	1.64
Infiltec	Polycon 0.1	hydrophiles Polycarbonat	0.73	1.68
Infiltec	Polycon 1	hydrophiles Polycarbonat	3.33	1.86

**Beispiel 2b**

Isolierung freier RNA aus wäßriger Lösung durch Bindung an hydrophile Membranen

- 5        Entsprechend dem Beispiel 1b werden Plastiksäulen mit verschiedenen hydrophilen Membranen hergestellt.
- 10      100 µl einer Gesamt-RNA enthaltenden wäßrigen Lösung wird mit 350 µl eines kommerziell erhältlichen Guanidinium-Isothiocyanat enthaltenden Lysepuffers - z. B. RLT-Puffer der Fa. Qiagen - vermischt. Anschließend werden 250 µl Ethanol zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Dieses Gemisch wird dann auf die Säule, aufgetragen und entsprechend Beispiel 4 durch die Membran geführt, gewaschen und getrocknet.
- 15      Abschließend wird die RNA wie bereits im Beispiel 3 beschrieben mit RNase-freiem Wasser eluiert und mittels einer Pipette von der Membran abgenommen.
- 20      Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird anschließend durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt und die Qualität der RNA durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt.
- 25      Die Ergebnisse der Isolierungen mit den verschiedenen hydrophilen Membranen sind in der nachfolgenden Tabelle 2b aufgeführt. Es werden 2 - 5 Parallelversuche pro Membran durchgeführt und jeweils der Mittelwert errechnet. Durch die Verwendung einer Silica-Membran kann kein meßbarer Anteil an Gesamt-RNA isoliert werden, wenn das Eluat durch eine Abnahme von oben von der Membran gewonnen wird.

Tabelle 2b: Isolierung freier RNA aus wässriger Lösung durch Bindung an hydrophile Membranen

Hersteller	Membran	Material	RNA ( $\mu$ g)	260 nm/ 280nm
Pall Gelman Sciences	I.C.E.-450	hydrophiles Polyethersulfon	1.92	1.82
Pall Gelman Sciences	I.C.E.-450sup	hydrophiles Polyethersulfon auf einem Polyestergewebe	0.87	1.67
Pall Gelman Sciences	Supor - 800	hydrophiles Polyethersulfon	3.93	1.74
Pall Gelman Sciences	Supor - 450	hydrophiles Polyethersulfon	1.78	1.74
Pall Gelman Sciences	Supor - 100	hydrophiles Polyethersulfon	1.04	1.68
GORE - TEX	Polypropylen 9339	hydrophiles Polytetrafluorethylen auf Polypropylen Gewebe	0.43	1.48
GORE - TEX	Polypropylen-Vlies 9338	hydrophiles Polytetrafluorethylen auf Polypropylen-Vlies	3.63	1.64
GORE - TEX	Polyester-Vlies 9318	hydrophiles Polytetrafluorethylen auf Polypropylen-Vlies	5.92	1.67
Millipore	Durapore PVDF	hydrophilisiertes Polyvinylidenfluorid	1.18	1.79
Millipore	hydrophylisierte PTFE	hydrophilisiertes Polytetrafluorethylen	2.84	1.72
Sartorius	Membranfilter Typ 250	hydrophiles Polyamid	2.7	1.7

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren mit den folgenden Schritten:
  - 5 - Beschicken einer Oberfläche aus einer Richtung mit Nukleinsäuren;
  - Immobilisieren der Nukleinsäuren an der Oberfläche;
  - 10 - Ablösen der immobilisierten Nukleinsäuren von der Oberfläche; und
  - Abnehmen der abgelösten Nukleinsäuren von der Oberfläche in im wesentlichen der Richtung der Beschickung.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Beschicken von oben erfolgt.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem Immobilisierungs- und dem Ablöseschritt ein Waschen der immobilisierten Nukleinsäuren mit zumindest einem Waschpuffer erfolgt.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Waschen für jeden Waschpuffer folgende Schritte umfasst:
  - 30 - Aufbringen einer vorbestimmten Menge an Waschpuffer auf die Oberfläche; und
  - Durchsaugen des Waschpuffers durch die Oberfläche.
- 35 5. Verfahren nach einem der vorliegenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Beschicken und Immobilisieren der Nukleinsäuren folgende Schritte umfasst:

- Mischen der Nukleinsäuren mit einem Immobilisierungspuffer,
- 5
- Beschicken der Nukleinsäuren mit dem Immobilisierungspuffer auf die Oberfläche
- 10
- Durchsaugen der füssigen Bestandteile durch die Oberfläche in im wesentlichen der Richtung der Beschickung.
- 15
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest einer der Schritte durch einen Automaten vollautomatisch durchgeführt wird.
- 20
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß alle Schritte des Verfahrens durch einen Automaten in gesteuerter Abfolge durchgeführt werden.
- 25
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mehrzahl von Nukleinsäureisolierungen gleichzeitig durchgeführt werden.
- 30
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem Ablöse- und dem Abnehmschritt zumindest einmal folgende Schritte durchgeführt werden:
    - Durchführen zumindest einer chemischen Reaktion an den Nukleinsäuren;
    - Immobilisieren der Nukleinsäuren an der Oberfläche; und

- Ablösen der immobilisierten Nukleinsäuren von der Oberfläche.
10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen der Alkali- oder Erdalkalimetalle mit Mineralsäuren eingesetzt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren Alkali- oder Erdalkalihalogenide -oder -sulfate eingesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren Halogenide des Natriums oder Kaliums oder Magnesiumsulfat eingesetzt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen von ein- oder mehrbasischen oder polyfunktionellen organischen Säuren mit Alkalii- oder Erdalkalimetallen eingesetzt werden.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Sälzen des Natriums, des Kaliums oder des Magnesiums mit organischen Dicarbonsäuren eingesetzt werden.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Dicarbonsäure Oxalsäure, Malonsäure und/oder Bernsteinsäure ist.
16. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen des Natriums oder des Kaliums mit einer Hydroxy- oder Polyhydroxycarbonsäure eingesetzt werden.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyhydroxycarbonsäure Zitronensäure ist.

5 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren Hydroxylderivate von aliphatischen oder acyclischen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffen eingesetzt werden.

10 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Hydroxylderivate C1-C5-Alkanole eingesetzt werden.

15 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß als C1-C5-Alkanole Methanol, Ethanol, n-Propanol, tert.-Butanol und/oder Pentanole eingesetzt werden.

20 21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Hydroxylderivat ein Aldit eingesetzt wird.

25 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren ein Phenol oder Polyphenol eingesetzt wird.

25 23. Verfahren nach Ansprüche 3 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß zum Waschen der immobilisierten Nukleinsäuren eine Salzlösung oder eine Pufferlösung gemäß einem der Ansprüche 4 bis 22 eingesetzt wird.

30 24. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Ablösen der Nukleinsäuren eine wässrige Salz- oder Pufferlösung eingesetzt wird.

35 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß zum Ablösen der Nukleinsäuren Wasser eingesetzt wird.

26. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren chaotrope Agenzien eingesetzt werden.

5

27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das chaotrope Agenz ein Salz aus der Gruppe der Trichloracetate, Thiocyanate, Perchlorate, Jodide oder Guanidin-Hydrochlorid, Guanidinium-iso-thiocyanat oder Harnstoff ist.

10

28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß 0,01 molare bis 10 molare wässrige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.

15

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß 0,1 molare bis 7 molare wässrige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.

20

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß 0,2 molare bis 5 molare wässrige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.

25

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässrige Lösung von Natriumperchlorat, Guanidinium-Hydrochlorid, Guanidinium-iso-thiocyanat, Natriumiodid und/oder Kaliumiodid zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt wird.

30

32. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche eine Membran ist.

35

33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran eine hydrophobe Membran ist.

34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophobe Membran aus einem Polymer mit polaren Gruppen aufgebaut ist.

35. Verfahren nach Anspruch 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran eine hydrophile Membran mit einer hydrophobisierten Oberfläche ist.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran aus Nylon, einem Polysulfon, Polyethersulfon, Polycarbonat, Polyacrylat sowie einem Acrylsäurecopolymeren, Polyurethan, Polyamid, Polyvinylchlorid, Polyfluorocarbonat, Polytetrafluoroethylen, Polyvinylidenfluorid, Polyvinylidendifluorid, Polyethylentetrafluoroethylen-Copolymerisat, einem Polyethylenchlorotrifluoroethylen-Copolymerisat oder Polyphenylensulfid besteht.

37. Verfahren nach Anspruch 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, daß Oberfläche oder die Membran aus einem hydrophobisierten Nylon besteht.

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran mit einem Hydrophobisierungsmittel aus der Gruppe der Paraffine, Wachse, Metallseifen ggf. mit Zusätzen an Aluminium bzw. Zirkoniumsalzen, quartären organischen Verbindungen, Harnstoffderivate, fettstoffmodifizierten Melaminharze, Silicone, zinkorganischen Verbindungen und/oder mit Glutardialdehyd beschichtet ist.

39. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran eine hydrophile oder hydrophilisierte Membran ist.
- 5      40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran aus hydrophilisiertem Nylon, Polyethersulfon, Polycarbonat, Polyacrylat sowie einem Acrylsäurecopolymeren, Polyurethan, Polyamid, Polyvinylchlorid, Polytetrafluoroethylen, Polyvinylidenfluorid, Polyvinylidendifluorid, Polyethylentetrafluoroethylen-Copolymerisat, einem Polyethylenchlorotrifluoroethylen-Copolymerisat oder Polyphenylensulfid besteht.
- 10     41. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran einen Porendurchmesser von 0,001 bis 50 Mikrometer, vorzugsweise 0,01 bis 20 Mikrometer, besonders bevorzugt 0,05 bis 10 Mikrometer besitzt.
- 15     42. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche ein hydrophobes Vlies ist.
- 20     43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß das Vlies ein Silica-Gel-Vlies ist.
- 25     44. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren chaotrope Agenzien eingesetzt werden.
- 30     45. Verfahren nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß das chaotrope Agenz ein Salz aus der Gruppe der Trichloracetate, Thiocyanate, Perchlorate, Jodide oder Guanidin-Hydrochlorid, Guanidin-iso-thiocyanat oder Harnstoff ist.

46. Verfahren nach Anspruch 44 oder 45, dadurch gekennzeichnet, daß 0,01 molare bis 10 molare wässerige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.
- 5
47. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß 0,1 molare bis 7 molare wässerige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.
- 10
48. Verfahren nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, daß 0,2 molare bis 5 molare wässerige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.
- 15
49. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 48, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässerige Lösung von Natriumperchlorat, Guanidinium-Hydrochlorid, Guanidinium-iso-thiocyanat, Natriumiodid und/oder Kaliumiodid zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt wird.
- 20
50. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Immobilisierung bei einem pH von 3 bis 11 erfolgt.
- 25
51. Verwendung zumindest einer Membran zum Immobilisieren von Nukleinsäuren auf einer Seite der Membran und Ablösen der Nukleinsäuren an derselben Seite zu deren Isolierung.
- 30
52. Verwendung nach Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran aus Nylon, Polysulfon, Polyethersulfon, Polycarbonat, Polyacrylat sowie Acrylsäurecopolymer, Polyurethan, Polyamid, Polyvinylchlorid, Polyfluorocarbonat, Polytetrafluoroethylen,
- 35

Polyvinylidenfluorid, Polyvinylidendifluorid,  
Polyethylentetrafluoroethylen-Copolymerisat,  
Polyethylenchlorodifluoroethylen-Copolymerisat oder  
Polyphenylensulfid besteht.

5

53. Verwendung nach Anspruch 52, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran eine hydrophobisierte Nylon-Membran ist.

10 54. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 53, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche oder Membran eine hydrophile Oberfläche oder Membran ist, die mit einem Hydropobisierungsmittel aus der Gruppe der Paraffine, Wachse, Metallseifen ggf. mit Zusätzen an Aluminium bzw. Zirkoniumsalzen, quartären organische Verbindungen, Harnstoffderivate, fettstoffmodifizierten Melaminharze, 15 Silicone, zinkorganischen Verbindungen und/oder mit Glutardialdehyd überzogen ist.

20 55. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 54, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mehrzahl von Membranen in Isoliergefäßen auf einer Multiwellplatte angeordnet sind.

25 56. Automat, dadurch gekennzeichnet, daß er das Verfahren eines der Ansprüche 1 bis 49 ausführen kann.

30 57. Automat nach Anspruch 55, dadurch gekennzeichnet, daß er mit zumindest eine Saugvorrichtung ausgestattet ist, die das Zugeben von Puffern und Lösungen auf die Oberfläche und von der Oberfläche weg ausführt oder ausführen kann.

58. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 50, dadurch gekennzeichnet, daß das Immobilisieren der Nukleinsäuren bei einem pH von 3 bis 11 erfolgt.

1/5

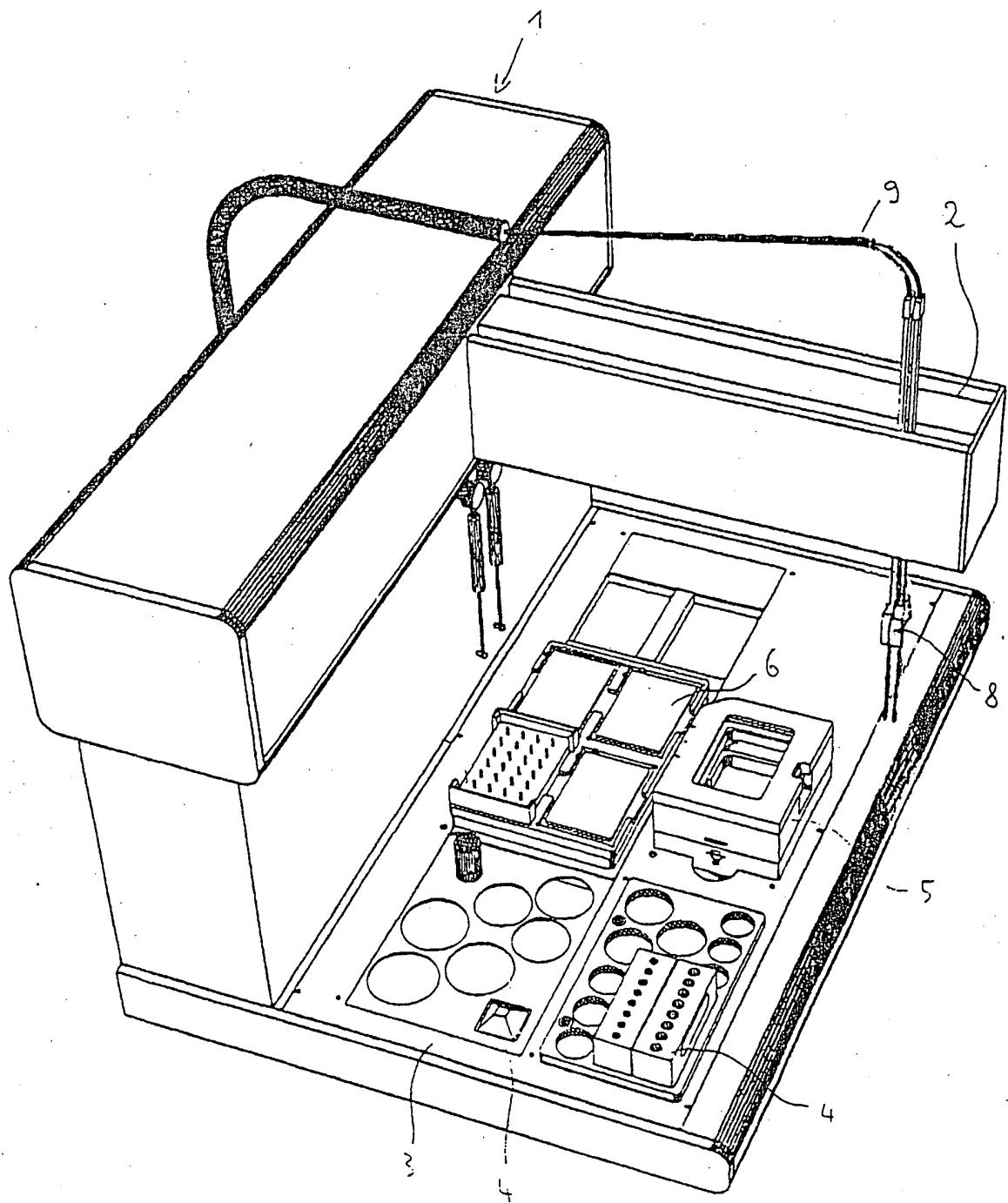


Fig. 1

2/5

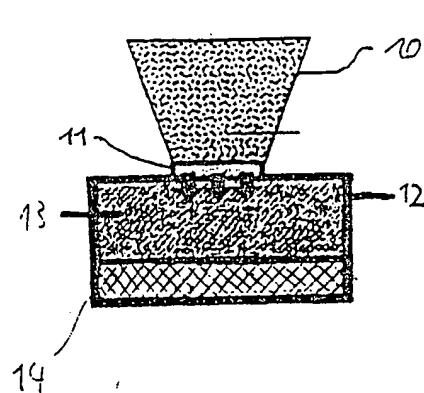


Fig. 2 a

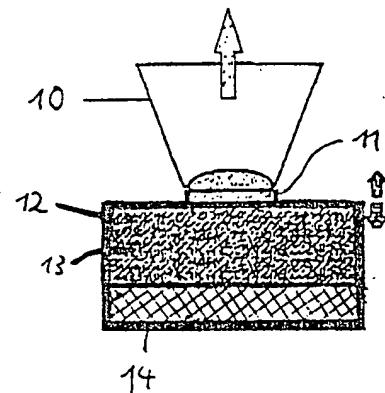


Fig. 2 b

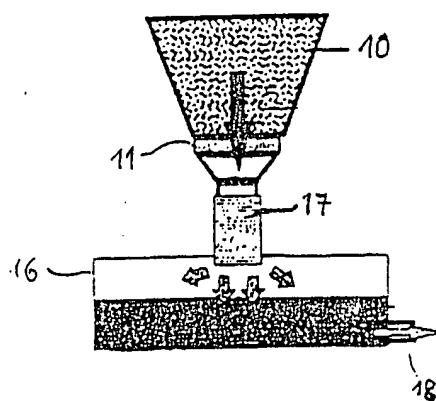


Fig. 3 a

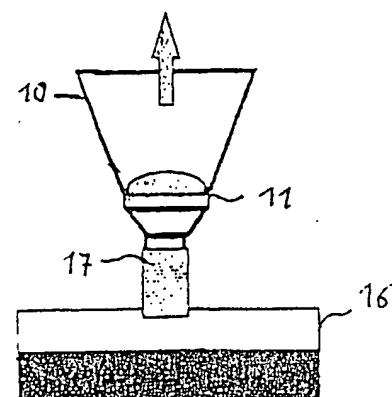


Fig. 3 b

3/5

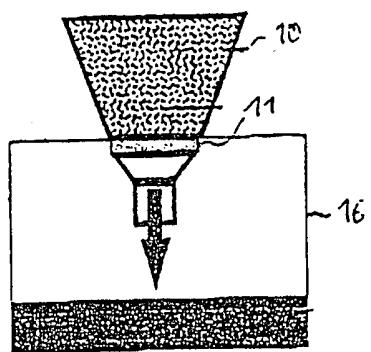


Fig. 4 a

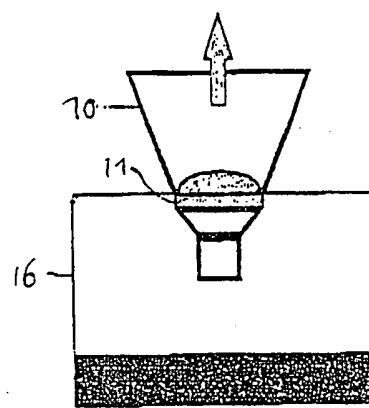


Fig. 4 b

4/5

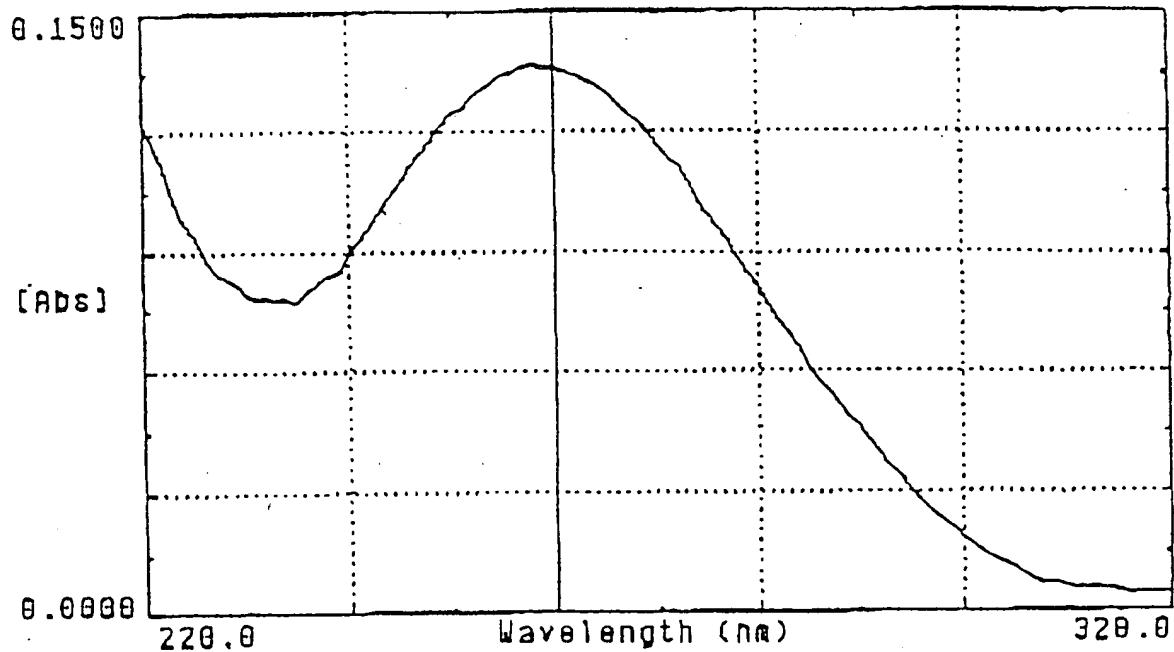


Fig. 5

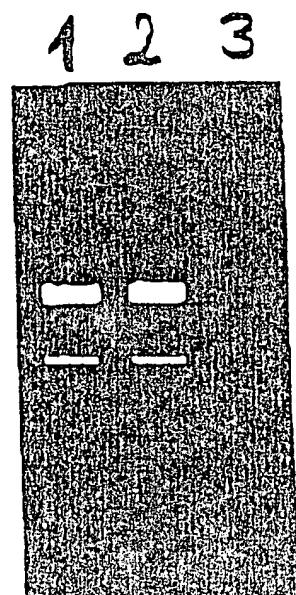


Fig. 6

5/5

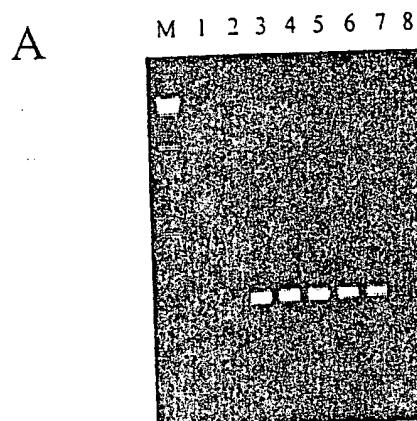


Fig. 7 a

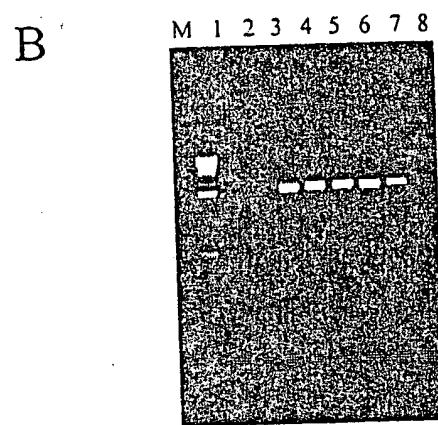


Fig. 7 b

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/EP 98/06756

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 649 853 A (BECTON DICKINSON AND CO.) 26 April 1995 see the whole document, in particular Example 2, claim 10 ---	1-4
X	WO 87 06621 A (GILLESPIE D.) 5 November 1987 cited in the application  see page 14, column 13 - page 17, column 15 see page 44, line 19 - page 45, line 21 ---	1-3, 10-12, 23,24, 26-33, 51-53
X	EP 0 487 028 A (SHIMADZU CORPORATION) 27 May 1992 see claims ---	56,57
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

1 February 1999

05/02/1999

Name and mailing address of the ISA

Authorized officer

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/06756

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 389 063 A (AKZO N.V.) 26 September 1990 see page 2, line 33 - page 3, line 54 see page 5, line 40 - page 8, line 25; claims ---	1
A	B. VOGELSTEIN ET AL.: "Preparative and analytical purification of DNA from agarose" PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, vol. 76, February 1979, pages 615-619, XP000607195 USA cited in the application see abstract see page 616, column 1, line 49 - page 617, column 1, line 7 ---	1-53
P,X	EP 0 814 156 A (THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH) 29 December 1997 see page 2, line 35 - page 3, line 55 see claims; example 2 ---	1-51

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Int ional Application No

PCT/EP 98/06756

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 649853	A	26-04-1995		US 5438127 A JP 2566383 B JP 7177887 A US 5650506 A US 5616701 A US 5606046 A US 5610290 A US 5610291 A		01-08-1995 25-12-1996 18-07-1995 22-07-1997 01-04-1997 25-02-1997 11-03-1997 11-03-1997
WO 8706621	A	05-11-1987		AT 114334 T AU 613870 B AU 7432987 A CA 1301606 A DE 3750774 D DE 3750774 T EP 0305399 A JP 2552691 B JP 1502317 T US 5482834 A		15-12-1994 15-08-1991 24-11-1987 26-05-1992 05-01-1995 27-04-1995 08-03-1989 13-11-1996 17-08-1989 09-01-1996
EP 487028	A	27-05-1992		JP 4187077 A		03-07-1992
EP 389063	A	26-09-1990		NL 8900725 A AT 156830 T AU 641641 B AU 5215390 A CA 2012777 A DE 69031237 D DE 69031237 T DE 389063 T DK 389063 T EP 0819696 A ES 2085245 T GR 96300019 T GR 3025351 T JP 2289596 A JP 2680462 B JP 10072485 A US 5234809 A		16-10-1990 15-08-1997 30-09-1993 27-09-1990 23-09-1990 18-09-1997 02-01-1998 10-10-1996 30-03-1998 21-01-1998 01-06-1996 31-03-1996 27-02-1998 29-11-1990 19-11-1997 17-03-1998 10-08-1993
EP 814156	A	29-12-1997		CA 2207852 A JP 10155481 A		18-12-1997 16-06-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06756

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 649 853 A (BECTON DICKINSON AND CO.) 26. April 1995 siehe das ganze Dokument, insbesondere Beisp. 2, Anspr. 10 ---	1-4
X	WO 87 06621 A (GILLESPIE D.) 5. November 1987 in der Anmeldung erwähnt  siehe Seite 14, Spalte 13 - Seite 17, Spalte 15 siehe Seite 44, Zeile 19 - Seite 45, Zeile 21 ---	1-3, 10-12, 23,24, 26-33, 51-53
X	EP 0 487 028 A (SHIMADZU CORPORATION) 27. Mai 1992 siehe Ansprüche ---	56,57
		-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "X" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Z" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

1. Februar 1999

05/02/1999

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06756

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 389 063 A (AKZO N.V.) 26. September 1990 siehe Seite 2, Zeile 33 - Seite 3, Zeile 54 siehe Seite 5, Zeile 40 - Seite 8, Zeile 25; Ansprüche ---	1
A	B. VOGELSTEIN ET AL.: "Preparative and analytical purification of DNA from agarose" PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, Bd. 76, Februar 1979, Seiten 615-619, XP000607195 USA in der Anmeldung erwähnt siehe abstract siehe Seite 616, Spalte 1, Zeile 49 - Seite 617, Spalte 1, Zeile 7 ---	1-53
P, X	EP 0 814 156 A (THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH) 29. Dezember 1997 siehe Seite 2, Zeile 35 - Seite 3, Zeile 55 siehe Ansprüche; Beispiel 2 -----	1-51

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. Dales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06756

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 649853 A	26-04-1995	US	5438127 A	01-08-1995
		JP	2566383 B	25-12-1996
		JP	7177887 A	18-07-1995
		US	5650506 A	22-07-1997
		US	5616701 A	01-04-1997
		US	5606046 A	25-02-1997
		US	5610290 A	11-03-1997
		US	5610291 A	11-03-1997
WO 8706621 A	05-11-1987	AT	114334 T	15-12-1994
		AU	613870 B	15-08-1991
		AU	7432987 A	24-11-1987
		CA	1301606 A	26-05-1992
		DE	3750774 D	05-01-1995
		DE	3750774 T	27-04-1995
		EP	0305399 A	08-03-1989
		JP	2552691 B	13-11-1996
		JP	1502317 T	17-08-1989
		US	5482834 A	09-01-1996
EP 487028 A	27-05-1992	JP	4187077 A	03-07-1992
EP 389063 A	26-09-1990	NL	8900725 A	16-10-1990
		AT	156830 T	15-08-1997
		AU	641641 B	30-09-1993
		AU	5215390 A	27-09-1990
		CA	2012777 A	23-09-1990
		DE	69031237 D	18-09-1997
		DE	69031237 T	02-01-1998
		DE	389063 T	10-10-1996
		DK	389063 T	30-03-1998
		EP	0819696 A	21-01-1998
		ES	2085245 T	01-06-1996
		GR	96300019 T	31-03-1996
		GR	3025351 T	27-02-1998
		JP	2289596 A	29-11-1990
		JP	2680462 B	19-11-1997
		JP	10072485 A	17-03-1998
		US	5234809 A	10-08-1993
EP 814156 A	29-12-1997	CA	2207852 A	18-12-1997
		JP	10155481 A	16-06-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)